

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Marko Leevik

**RIC8 olulisuse uurimine spermatogeneesis, kasutades mudelina
isassugurakkude spetsiifilist *Stra8Cre^{+/-}Ric8^{lacZ/lox}* hiireliini**

Bakalaureusetöö geenitehnoloogias

12 EAP

Juhendajad MSc Sirje Lulla
PhD Tambet Tõnissoo

TARTU 2016

INFOLEHT

RIC8 olulisuse uurimine spermatogeneesis, kasutades mudelina isassugurakkude spetsiifilist *Stra8Cre*^{+/+}*Ric8*^{lacZ/lox} hiireliini

Sugurakud on ainsad rakud, mis võimaldavad järglastele edasi kanda vanematelt pärit geneetilist informatsiooni. Spermatogenees hõlmab endas sümmeetrilist ning asümmeetrilist jagunemist ning vastavate protsesside eest vastutavad evolutsiooniliselt konserveerunud valgud, näiteks RIC8. Uurimaks RIC8 olulisust spermatogeneesi protsessis, lülitati spermatogoonides vastav valk hiirtel alates arengujärgust P3 välja. Käesoleva bakalaureusetöö eksperimentaalses osas saadud tulemustele toetudes tehti järgnevad järeldused: RIC8 konditsionaalne väljalülitamine spermatogoonidest ei põhjusta muutusi väänilistes seemnetorukestes olevate rakkude populatsioonis, kuid *Ric8*^{-/-} genoomiga isenditel esinesid häired spermatogeense epiteeli struktuuris ning rakkude korrapärases paiknemises väänilistes seemnetorukestes.

Märkõnad: spermatogenees, RIC8, spermatogeensed rakud, vääniline seemnetoruke

CERCS kood: Arengubioloogia, loomade kasv, ontogenees, embrüoloogia

The role of RIC8 in murine spermatogenesis using germ-cell specific conditional *Stra8Cre*^{+/+}*Ric8*^{lacZ/lox} mouse strain

Gametes are unique cells that provide a transmission of genetic information to the next generation. It has been revealed that gametogenesis is a sensitive process which comprises symmetrical and asymmetrical cell division. These processes are regulated by evolutionally conserved proteins, for instance RIC8. In the current study the *Ric8* gene was conditionally knocked-out since P3 spermatogonia to research the role of RIC8 in spermatogenesis. According to the results it can be assumed that deletion of RIC8 from P3 spermatogonia do not cause any changes in population of spermatogenic cells and Sertoli cells. However, the structure of spermatogenic epithelium and the localization of spermatogenic cells was defective in *Ric8*^{-/-} mice.

Key words: spermatogenesis, RIC8, spermatogenic cells, seminiferous tubule

CERCS code: B350 Development biology, growth (animal), ontogeny, embryology

SISUKORD

INFOLEHT.....	2
KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	6
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	7
1.1. Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8.....	7
1.1.1. RIC8 üldine iseloomustus.....	7
1.1.2. RIC8 biokeemiline funktsioon	7
1.1.3. RIC8 roll närvisüsteemis	9
1.1.4. RIC8 roll varajases embrüogeneesis ja rakujagunemises.....	11
1.2. Postnataalne spermatogenees.....	12
1.2.1. Spermiatsioon	16
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	18
2.1. Töö eesmärgid.....	18
2.2. Materjal ja meetodid	18
2.2.1. Hiireliin <i>Stra8Ric8^{CKO}</i>	18
2.2.2. Hiirte genotüüpiseerimine	19
2.2.3. Parafiinilõikude valmistamine.....	20
2.2.4. Histoloogiliste preparaate valmistamine	20
2.2.5. Preparaatide pildistamine	21
2.2.6. Vääniliste seemnetorukeste defektide hindamine.....	21
2.2.7. Väänilistes seemnetorukestes olevate spermatogeensete rakkude loendamine..	21
2.2.8. Statistiline analüüs.....	23
2.3. Tulemused.....	24
2.3.1. RIC8 puudusest tingitud anatoomilised-morfoloogilised defektid munandites ..	24
2.3.2. Väänilistes seemnetorukestes olevate rakkude populatsioonid	28
2.4. Arutelu	33
KOKKUVÕTE	36
SUMMARY	37
KASUTATUD KIRJANDUS	38
LIHTLITSENTS.....	47

KASUTATUD LÜHENDID

A_s - *A-single spermatogonia*

A_{pr} - *A-paired spermatogonia*

A_{al} - *A-aligned spermatogonia*

BAX - *BCL2-associated X protein*

BCL2 - *B cell leukemia/lymphoma 2*

BCL-XL - *Bcl2l1 - BCL2-like 1*

CCT - *concerted action of chaperonin*

DAG – diatsüülgütserool

ddH₂O – deioniseeritud vesi

E - embrüonaalne arengupäev

ES – ectoplasmatic specialization

FSH - folliikuleid stimuleeriv hormoon

GAP - *GTPase activating protein*

GEF - *guanine nucleotide exchange factor*

GOA-1 - *Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha*

GPA-16 - *Guanine nucleotide-binding protein alpha-16 subunit*

GPCR - *G-protein coupled receptors*

LGN - *Leu-Gly-Asn repeat enriched proteins*

NuMa - *nuclear mitotic apparatus*

P - postnataalne arengupäev

PAR - *partitionating protein*

PFA - paraformaldehüüd

PBS - fosfaat-puhverdatud soolalahus

PhLP-1 - *phosducin-like protein-1*

RGS - *regulator of G protein signalling*

RGS7 - *regulator of G protein signalling 7*

RIC8 - *Resistance to Inhibitors of Cholinesterase 8*

SSC – *spermatogonial stem cells*

TBC – *tubulo-bulbaarne kompleks*

SISSEJUHATUS

Suguliselt paljunevate organismide võime saada järglasi sõltub vahetult elujõuliste sugurakkude korrektsest valmimisest ehk gametogeneesist. Sugurakud on ainsad rakud organismis, mis võimaldavad järglastele edasi kanda vanematelt pärit geneetilist informatsiooni. Antud rakkude, mida iseloomustab haploidne kromosoomistik, allasurutud ainevahetus ja puuduv jagunemisvõime, areng algab diploidsetest eellasrakkudest meioosi teel ning leiab aset isasorganismidel munandites ning emasorganismidel munasarjades. Gametogenees hõlmab endas nii sümmeetrilist kui ka asümmeetrilist raku jagunemist ning vastavate protsesside eest vastutavad mitmed evolutsiooniliselt konserveerunud valgukompleksid. Üheks kesksemaks raku jagunemise reguleerijaks on heterotrimeersed G-valgud, mille retseptorid paiknevad rakkude pinnal, sidudes endaga erinevaid ligande ning vahendades seekaudu signaale rakult rakule. G-valkude vahendatud signaale võimendab guaniini nukleotiidivahetusfaktor (GEF), mille üheks näiteks on antud bakalaureusetöös käsitletav RIC8 valk. Mitmed uurimustööd on näidanud, et RIC8 puudumine põhjustab häireid signaali ülekandes ning rakkude sümmeetrilises ja asümmeetrilises jagunemises.

Häired nii emas- kui ka isassugurakkude valmimisel võivad põhjustada viljakuse langust. Põhjused võivad olla tingitud nii geneetilistest kui keskkonnafaktoritest. Maailma Tervishoiuorganisatsiooni andmetel on 15% paaridest kogu maailmas raskusi lapse saamisega. Tänapäeval on üha enam uuritud meeste viljakust mõjutavaid faktoreid ning on leitud, et viljatuse põhjused on ligikaudu 40% mehepoolsed.

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli uurida, kas guaniini nukleotiidivahetusfaktori RIC8 konditsionaalne väljalülitamine koduhiire (*Mus musculus*) P3 arengujärgus olevatest spermatogoonidest põhjustab häireid spermatogeneesis. Kitsamateks eesmärkideks oli välja selgitada RIC8 puudusest tingitud anatoomilised-morfoloogilised defektid väänilistes seemnetorukestes ning vääniliste seemnetorukeste rakkude populatsioonid, kasutades mudelina *Stra8Cre^{+/+}Ric8^{lacZ/lox}* hiireliini.

Bakalaureusetöö teoreetilises osas antakse kirjanduslik ülevaade koduhiire postembrüonaalsest spermatogeneesist ning kirjeldatakse guaniini nukleotiidivahetusfaktori RIC8 bioloogilist rolli närvisüsteemis, varajases embrüogeneesis ja asümmeetrilises jagunemises erinevate mudelorganismide näitel. Eksperimentaalses osas iseloomustatakse *Ric8 knock-out* suguküpsete isashiirte väänilistes seemnetorukestes olevaid defekte ning väänilistes seemnetorukestes olevate rakkude populatsioone.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8

1.1.1. RIC8 üldine iseloomustus

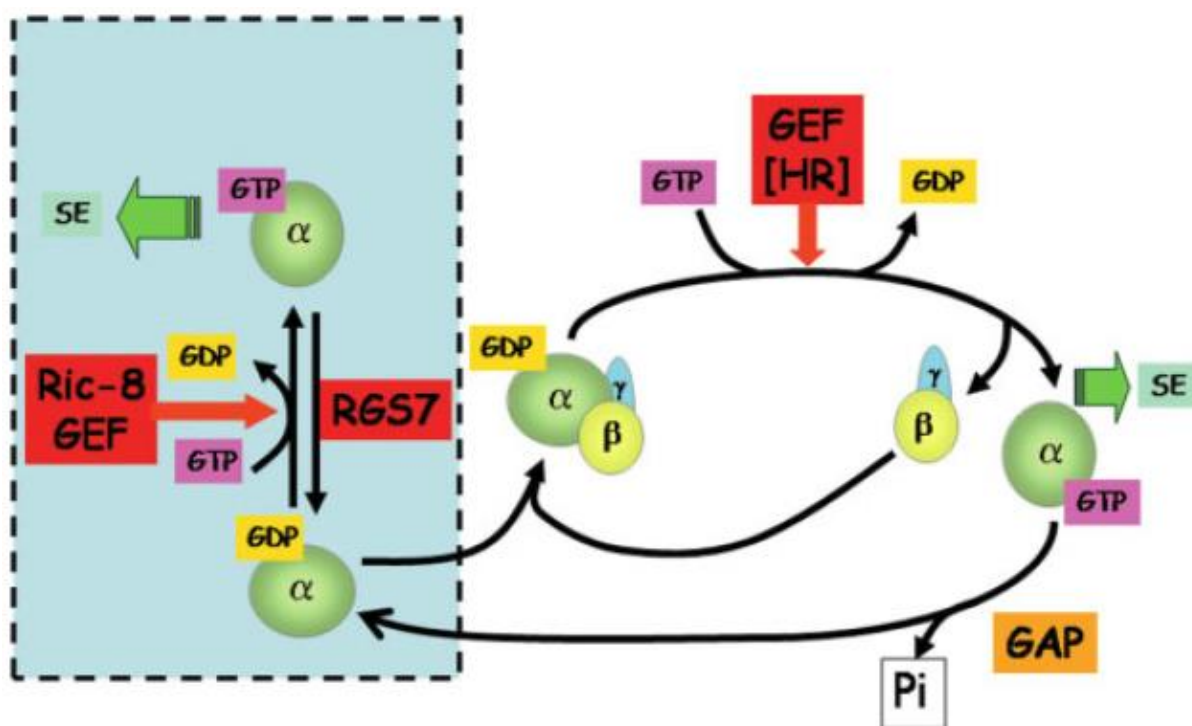
RIC8 (*resistant to inhibitors of cholinesterase*) on loomariigis evolutsiooniliselt konserveerunud 63kDa tsütoplasmaatiline valk (tuntud ka nime all kui Synembryn), mis isoleeriti esmakordselt *Caenorhabditis elegans*-i mutantidelt, kellel esines letaalsus koliinesteraasi inhibiitorite suhtes (Miller jt., 1996). Imetajates on kirjeldatud kaks RIC8 paralooget: RIC8A (edaspidi RIC8) ja RIC8B (Tall jt., 2003). Mudelorganismi *Xenopus laevis* põhjal on kirjeldatud vastava valgu struktuuri, nimelt koosneb RIC8 kümnest armadillo motiivist, mis on moodustunud kokkupakitud alfaheeliksitest (Figuroa jt., 2009). RIC8 funktsioneerib nukleotiidivahetusfaktorina (GEF-na) guaniin nukleotiidi siduvatele G-valgu subühikutele: $G\alpha_q$, $G\alpha_i$, $G\alpha_o$, $G\alpha_{13}$ (Tall jt., 2003). RIC8 valgu seost on näidatud mitmetes erinevates bioloogilistes protsessides: embrüonaalses arengus (Nagayoshi jt., 2008; Tõnissoo jt., 2010), sünaptilises signaaliüleandes (Miller jt., 2000; Malik jt., 2005; Reynolds jt., 2005; Schade jt., 2005; Wang jt., 2005; Nishimura jt., 2006; Fenech jt., 2009), rakkude jagunemises (Miller ja Rand, 2000; Afshar jt., 2004; Couwenbergs jt., 2004; Afshar jt., 2005; David jt., 2005; Hampoelz jt., 2005; Wang jt., 2005; Woodard jt., 2010), migratsioonis ja adhesioonis (Wang jt., 2011; Amoureux jt., 2012; Ma jt., 2012), närvisüsteemis (Klattenhoff jt. 2003; Tall jt. 2003; Tõnissoo jt., 2003; Couwenbergs jt. 2004; Reynolds jt. 2005; Schade jt. 2005; Vellano jt., 2010) ning lisaks toimib antud guaniini nukleotiidivahetusfaktor ka kui molekulaarne *chaperon* (Gabay jt., 2011; Thomas jt., 2011; Chan jt., 2013).

1.1.2. RIC8 biokeemiline funktsioon

Heterotrimeersed G-valgud koosnevad kolmest subühikust: α , β ja γ , mis toimivad kui ekstratsellulaarsed signaalide vahendajad (Gilman, 1987). G-valgu signaaliradasid jaotatakse kanooniliseks ja mittekanooniliseks (Hinrichs jt., 2012).

Kanoonilises G-valgu signaalirajas edastatakse rakuväline signaal G-valk seoseliste transmembraansete retseptorite (GPCR – G-protein coupled receptors) vahendusel heterotrimeersetele G-valkudele, mis kannavad selle edasi rakusisestele signaaliradadele (Neves jt., 2002). Antud signaalirada aktiveeritakse ligandi seostumisel GPCR tsütoplasmaatilise osaga (Bastiani jt., 2006), mille tagajärjel omandab retseptor guaniini

nukleotiidivahetusfaktori (GEF) aktiivsuse ning stimuleerib $G\alpha$ -subühikuga seotud GDP vahetamist GTP vastu. $G\alpha$ -GTP kompleks dissotsieerub $G\beta\gamma$ küljest ning seondub rakusisesse efektoriga, mis kannab signaali edasi (Neer, 1995). $G\alpha$ -subühikule omane GTP-aasne aktiivsus hüdrolüüsib GTP γ -fosfaadi, mille tulemusena taastub $G\alpha$ -GDP vorm, mis seostub uuesti $G\beta\gamma$ subühikuga ning signaal lõpetatakse (Joonis 1B) (Bastiani jt., 2006).



Joonis 1. Mittekanooniline ja kanooniline G-valkude poolt vahendatud signaalirada. (A) Mittekanoonilises signaalirajas aktiveeritakse heterotrimeerne G-valk retseptorsõltumatult. $G\alpha$ -GDP-ga seondub RIC8, mis stimuleerib GDP vabanemist kompleksist ja asendamist GTP-ga, aktiveerides G-valgu. G-valgu signalisatsiooni regulaator 7 (RGS7) deaktiveerib $G\alpha$ -GTP. **(B)** Kanoonilises signaalirajas aktiveeritakse heterotrimeerne G-valk ligandi seostumisel GPCR-i GEF aktiivsuse poolt. $G\alpha$ GTP-aasset aktiivsust aitavad reguleerida erinevad GAP valgd. $G\alpha$ valgu GTP-aasne aktiivsus (GAP) hüdrolüüsib GTP taas GDP-ks ning toimub taasühinemine $\beta\gamma$ dimeeriga. Lühendid: GEF, guaniini nukleotiidivahetusfaktor; Pi, fosfaatühend; RGS7, G-valgu signalisatsiooniregulaator 7; SE, efekt; (Hinrichs jt., 2012 järgi).

Mittekanoonilises G-valgu signaalirajas on GPCR vahetunud intratsellulaarse GEF-i, näiteks RIC8 vastu (Tall jt., 2003; Reynolds jt., 2005, Wilkie ja Kinch, 2005), mis toimib GEF-na $G\alpha_0$, $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ valkudele (Tall jt., 2003). Samuti on RIC8 interaktsiooni näidatud nii $G\alpha_s$ kui ka $G\alpha_{13}$ subühikutega (Klattenhoff jt., 2003; Tall jt., 2003). Antud signaalirajas seondub RIC8 ainult dissotsieerunud $G\alpha$ subühikuga. RIC8 interakteerub $G\alpha$ -GDP vormiga, mille tulemusena vabaneb GDP ja tekib stabiilne nukleotiidivaba kompleks RIC8- $G\alpha$. Sellise kompleksiga on

võimeline liituma GTP, mis vabastab RIC8 ja tekitab aktiivse $G\alpha$ -GTP vormi (Tall jt., 2003; Reynolds jt., 2005, Wilkie ja Kinch, 2005). Seondudes nukleotiidivaba $G\alpha$ subühikuga võib üheks RIC8 võimalikuks funktsiooniks pidada G-valgu signaali võimendamist ning selle kestvuse pikendamist (Tall jt., 2003) (Joonis 1A).

RGS perekonna valgud (*regulator of G-protein signaling proteins*) on inhibiitorid aktiivsele $G\alpha$ -GTP vormile, seondudes aktiivse $G\alpha$ subühikuga ja stimuleerides selle GTP-aasset aktiivsust. Selle tulemusel lüheneb aktiivse $G\alpha$ -GTP vormi eluiga ja väheneb G-valkude poolt edasikantav signaal (De Vries jt., 2000) (Joonis 1A). RIC8 on võimeline vabastama $G\alpha$ subühikuid RGS valkude inhibeerivast efektist, vabastades RGS- $G\alpha$ -GDP kompleksist GDP ja võimaldades GTP seondumist $G\alpha$ subühikuga (Vellano jt., 2011) (Joonis 1A).

2011. aastal avaldas Gregory G. Tall-i töörühm teadusartikli, milles tutvustati RIC8 uudset võimalikku rolli. Eelpool mainitud teadusartiklis kirjeldati, et RIC8 toimib kui molekulaarne *chaperon*, osaledes sünteesitud $G\alpha$ -subühiku seondumisel endomembraaniga. Tsütosoolsetes ribosoomides sünteesitud $G\alpha$ -subühiku valguahelad ei ole võimelised seostuma guaniinnukleotiididega enne, kui nad pole tsütosoolis korralikult voltunud ega tekkinud guaniinnukleotiidi seondumistaskut. Kui RIC8 seondub ribosoomil sünteesitud $G\alpha$ -le, võib see olla korrektse voltumise üks faktoritest. $G\alpha$ pakkimise ajal tekib ajutine RIC8- $G\alpha$ -CCT (CCT-*concerted action of chaperonin*) kompleks, sisaldades veel PhLP-1 (*phosducin-like protein-1*) valku. Pärast pakkimist vabaneb RIC8- $G\alpha$ kompleks, kus RIC8, käitudes kui eskort-*chaperon*, transpordib nukleotiidivaba $G\alpha$ subühiku tsütoplasmavõrgustiku ehk endoplasmaatilise retiikulumi membraanspetsiifilisele faktorile. Tsütoplasmavõrgustikus dissotsieerub kompleksist RIC8 ning seejärel transporditakse $G\alpha$ -GDP kompleks plasmamembraanile. Tall-i töögrupi katsed on näidanud, et *Ric8*^{-/-} embrüonaalsete tüvirakkudes transleeritakse endogeenseid $G\alpha_i$ ja $G\alpha_q$ efektiivselt, kuid integreeritakse halvasti endomembraanidesse. Seetõttu jäävad paljud valgud tsütoplasmasse ning seejärel need degradeeritakse. Seekaudu tagatakse ühtlasi G-valkude optimaalne hulk plasmamembraanil. (Gabay jt., 2011; Chan jt., 2013)

1.1.3. RIC8 roll närvisüsteemis

Nukleotiidivahetusfaktori RIC8 rolli närvisüsteemis on näidatud erinevatel mudelorganismidel $G\alpha$ subühikute $G\alpha_q$, $G\alpha_i$ ja $G\alpha_s$ kaudu, mis moodustavad sünaptilise signaliseerimisvõrgustiku, mis vastutavad mitmesuguste protsesside eest nagu mälu, õppimise ja käitumise eest (Klattenhoff jt. 2003; Tall jt. 2003; Couwenbergs jt. 2004; Reynolds jt. 2005; Schade jt. 2005).

Eelpool mainitud $G\alpha$ subühikud moodustavad antagonistliku signaaliraja, mis kontrollib sünaptilist transmissiooni, reguleerides intratsellulaarset diatsüülgütserooli (DAG) kontsentratsiooni ning seekaudu neurotransmitterite sekretsiooni (Miller jt., 2000; Tall jt. 2003). Sünaptilise transmissiooni eest vastutav on subühik $G\alpha_q$, mis aktiveerib fosfolipaasi $C\beta$ ja seeläbi DAG tekkimise, mis omakorda on oluline kontrollimaks Ca^{2+} vabanemist (Smrcka jt., 1991; Singer jt., 1997). $G\alpha_o$ subühik mõjub sünaptilisele ülekandele inhibeerivalt, aktiveerides DAG kinaasi, vähendades seega DAG taset organismis (Miller jt., 2000). Nukleotiidivahetusfaktor RIC8 aktiveerib eelpool kirjeldatud signaaliraja nematoodis, mille tagajärjel tõuseb DAG tase ja väheneb atsetüülkoliini vabanemine sünapsis (Miller, 1996; Miller ja Rand, 2000). RIC8 mutantsetel täiskasvanud *C. elegans* isenditel täheldati ka resistentsust koliinesteriisi inhibiitori suhtes ning kahjustunud neurotransmitterite vabanemist, mis põhjustavad organismi vähenenud liikumisvõimet ja munemist, samuti vähenenud keha painutusvõimet (Miller jt., 1996; Miller ja Rand, 2000).

2003. aastal avastas Alar Karise töögrupp, et hiire varajases arengus E9.5–E12.5 on RIC8 tugevalt neurospetsiifiline, avaldudes kraniaalganglionides, neuraaltorus, sümpaatilises tüves, läätises, vomeronasaalorganis ja endolümfaatilises juhas. Täiskasvanud hiirel on RIC8 ekspresseeritud peaaegu mitmetes käitumuslikult tähtsates piirkondades: neokorteksis, hipokampuses, väikeajus, ajuripatsis, ependümaalses kihis, vöökäarus, juttkehas ja käbinäärmes (Tõnissoo jt., 2003). Haplodefitsiitsetel *Ric8*^{+/-} heterosügootsetel hiirtel esineb kõrgeenenud ärevus, vähenenud ruumiline tajus ja õppimisvõime (Tõnissoo jt., 2006). Kui *Ric8* välja lülitada postmitootilistest neuronitest, põhjustab see defektset neuromuskulaarset fenotüüpi ning sündinud isendid surevad postembrüonaalses vanuses P0–P6 (Ruisu jt., 2013). Kui *Ric8* välja lülitada neurogeneesi varasematel etappidel neuraalsetest eellasrakkudest, põhjustab see häireid neuraaltoru sulgemisel, rakkude migreerumist marginaaltsooni ning suurajukoore basaalmembraani katkendlikkust, mis omakorda põhjustab neuronite ebakorrektsel migratsiooni. Vastavad *knock-out* loomad surid 12 tundi pärast sündi ning neil esinesid käitumishäired (Kask jt., 2015). 2012. aastal tehtud uuringus, kus samuti elimineeriti neuraalsete eellasrakkude spetsiifiline *Ric8* ekspressioon, avastati, et väikeajus asetsevad Bergmanni gliia rakud ei kinnitu basaalmembraanile, millest tulenevalt väikeaju kihid ei moodustu korrektselt. (Ma jt., 2012).

1.1.4. RIC8 roll varajases embrüogeneesis ja rakujagunemises

Varajases embrüogeneesis tekivad asümmeetrilisel rakujagunemisel erineva suurusega tütararakud, mis hilisemas arengus võivad oma funktsioonilt ning mõõtmetelt erineda, andes aluse rakkude diferentseerumisele ja kudede kujunemisele (Horvitz ja Herskowitz, 1992). Asümmeetrilise jagunemise eelduseks on korrektne mitoosikäävi paigutumine ja rakkude polaarsus. Selle juures mängivad olulist rolli mitmesugused molekulaarsed faktorid, näiteks heterotrimeersed G-valgud ja nendega interakteeruvad valgud (Gotta ja Ahringer, 2001; Schaefer jt., 2001). Mudelorganismi *C. elegans* sügoodi anafaasis paigutub mitoosikääv asümmeetriliselt piki anterioposterioorset telge, mille tulemusena tekib asümmeetriline jagunemine: lõigustub suurem anteriorne ja väiksem posterioorne blastomeer (Grill jt., 2001). Asümmeetria on põhjustatud tõmbemehhanismide erinevusest mitoosikäävi eri poolustel, kus tugevama jõuga tõmbab posterioorne poolus. G-valkude GEF RIC8 on üks sellise asümmeetrilise jagunemise regulatsiooni võtmekomponente nematoodi varases embrüogeneesis. (Miller ja Rand, 2000; Afshar jt. 2004; Couwenbergs jt. 2004; Wilkie ja Kinch, 2005). *C. elegans*-i esimestel lõigustumiste etappidel osalevad RIC8 ja $G\alpha_o$ reguleerivad tsentrosoomide liikumist, P1 tsentrosoomi lamendumist, mitoosikäävi joondumist ja tuumade migratsiooni, mis on aluseks asümmeetrilistele blastomeeride jagunemisele (Miller jt., 2000; Afshar jt., 2004; Couwenbergs jt., 2004). RIC8 kontrollib käävi positsiooni formeerumist, modulleerides $G\alpha$ aktiivsust ning selle kaudu käävi tõmbejõudude tugevust (Couwenbergs jt., 2004). Lisaks osalevad *C. elegans*-i embrüo asümmeetrilises jagunemises $G\alpha_i$ perekonda kuuluvad GOA-1 (*Guanine nucleotide-binding protein G(o) subunit alpha*) ja GPA-16 (*Guanine nucleotide-binding protein alpha-16 subunit*) valgud ning nendega seonduvad GPR-1/2 valgud (*G-protein regulatory motif 1/2*), mille hulk lõigustuva embrüo posterioorsel poolusel on märgatavalt suurem (Colombo jt., 2003; Afshar jt., 2004). GPR-1/2 valgud moodustavad kompleksi GDP-seoselise $G\alpha$ valguga ning reguleerides pooluste tõmbejõu asümmeetrilisust (Gotta jt., 2003). RIC8 interakteerub nii GOA-1 kui ka GPA-16-ga (Afshar jt., 2004). Katsed on näidanud, et nende G-valkude elimineerimisel RNAi abil põhjustab tsentrosoomide tõmbejõu vähenemist ja võrdsustumist sügoodi eri poolustel, mistõttu *C. elegans*-i esimesel lõigustumisel on blastomeerid sümmeetrilised (Miller jt., 2000; Gotta jt., 2003). Ric8 rolli asümmeetrilise jagunemise kujunemises on näidatud ka teises mudelorganismis, kelleks on *Drosophila melanogaster*. Äädikakärbse embrüotega läbiviidud uurimused näitasid, et Ric8 osaleb neuraalsete eellasrakkude ehk neuroblastide ja sensoorsete eellasrakkude asümmeetrilises jagunemises, aidates reguleerida koostöös G-valkudega mitoosikäävi orientatsiooni ning selle kaudu säilitada tütarakkude suuruse erinevuseid. Kui

metsiktüüpi äädikakärbse embrüote neuraalsete eellasrakkude jagunemisel tekkinud mitoosikälv asus telje tasapinnal, siis *ric8* mutantsetes neuroblastides oli mitoosikälv nihkunud rohkem kui 20°. Selline kälv positsiooni muutus põhjustab neuroblastide sümmeetrilist raku jagunemist (David jt., 2005; Hampoelz jt., 2005; Wang jt., 2005). *ric8* väljalülitamine on embrüonaalselt letaalne nii äädikakärbes kui ka varbussis (Hampoelz jt., 2005; Wang jt., 2005).

Mitoosikävi orientatsiooni eest imetajarakkudel vastutab konserveerunud valkude kompleks, mis koosneb $G\alpha_i$, LGN (*Leu-Gly-Asn repeat enriched proteins*) ning NuMa-st (*Nuclear mitotic apparatus protein*), mis tekib kui GTP-aasset aktiivsust omav valk RGS-7 (G-valkude signalseermise regulaator) hüdrolüüsib $G\alpha$ -seoselise GTP GDP-ks (Vellano jt., 2011). Antud kompleks osaleb mikrotuubulite kortikaalsete kinnituste lõhkumises ja mitoosikävi rotatsioonis (Du ja Macara, 2004). Mitootilistes rakkudes seondub RIC8 $G\alpha_i$ -GDP-LGN-NuMa kompleksiga, vahetades GDP GTP vastu, ankurdades LGN, NuMa ja düneiini rakukorteksile ning aidates joondada mitoosikävi (Tall ja Gilman, 2005; Tall jt., 2003). RIC8 vabastab katalüütiliselt $G\alpha_i$ -GTP vormi ja põhjustab sellega NuMa ja LGN-i vabanemise. Vabanenud NuMa seondub mikrotuubulite mootorvalkudele, reguleerides astraalsete mikrotuubulite tõmbejõudusid (Du ja Macara, 2004). RIC8 lokaliseerub mitoosis rakukorteksis, poolustel, tsentromeeridel ning raku kontraktiilses aktiinirõngas (Woodard jt., 2010). *Ric8* ekspressiooni vähendamine põhjustab defekte $G\alpha_i$ -LGN-NuMa kompleksi dissotsiatsioonil ning mitoosikävi asetuses (Woodard jt., 2010). *Ric8* puudumine põhjustab koduhiirtel (*Mus musculus*) gastrulatsioonis mitmeid arenguhäireid, näiteks amnioni ja allantoisi moodustumise ning kavitatsiooni häired, basaalmembraani defektid, häired rakkude kinnitumisel ja migratsioonis, indutseeritud apoptoos embrüonaalses ektodermis ning embrüo kehatelgede vale paiknemine emaka suhtes. Eelpool mainitud arenguhäired kulmineeruvad embrüonaalse suremusega ajavahemikus E6.5–E8.5. (Tõnissoo jt., 2011)

1.2. Postnataalne spermatogenees

Spermatogenees on protsess, mille käigus arenevad primordiaalsest idutest rakkudest (PGC) isassugurakud ehk spermid. PGC-d kujunevad hiirel proksimaalse epiblasti rakkudest E6.5 arengupäeval, mis migreeruvad esialgu ekstraembrüonaalsesse mesodermi ning sealt edasi E10.5 arengupäevaks genitaalvalli (Ginsburg jt., 1990; Wistuba jt., 2007). Genitaalvalli jõudnud PGC-d nimetatakse gonotsüütideks (Ewen ja Koopman, 2010). Vanuses P0 paiknevad gonotsüüdid väänilise seemnetorukese tsentris (Drumond jt., 2011). Postnataalne

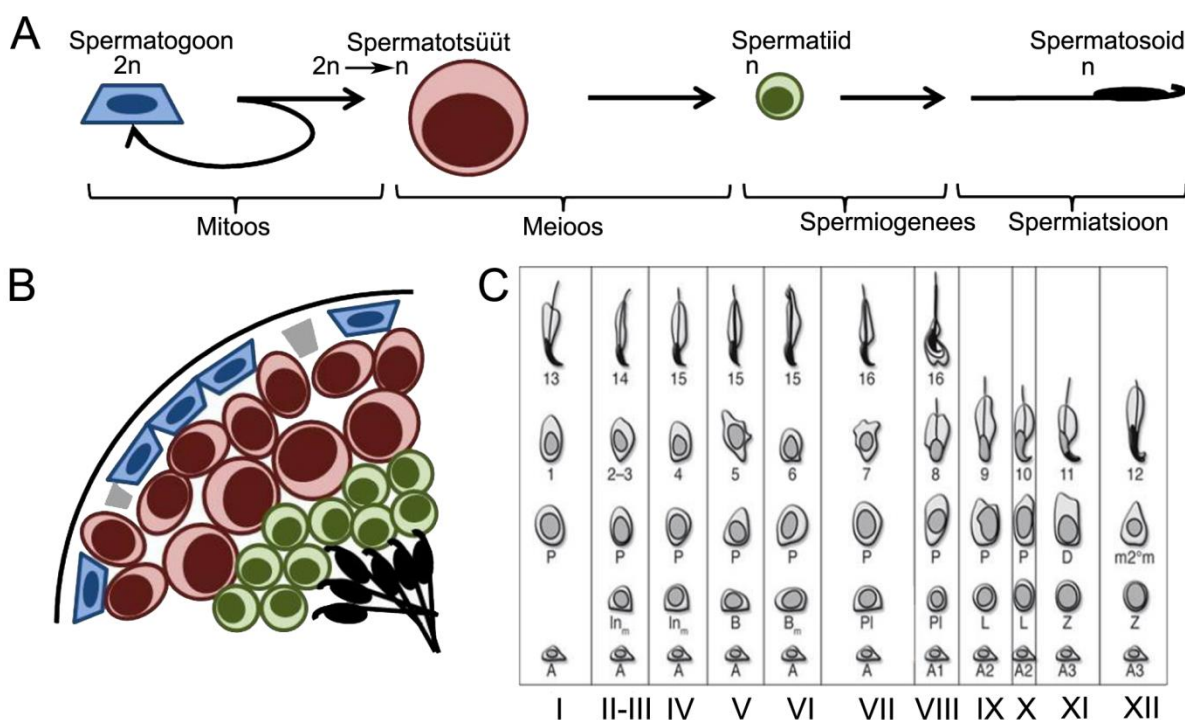
spermatogenees algab hiirtel vanuses P1–P3, kui gonotsüüdid läbivad järjestikku mitu mitootilist jagunemist ning liiguvad vastu väänilise seemnetorukese basaalmembraani. Väänilise seemnetorukese basaalmembraanis panevad gonotsüüdid aluse spermatogoonsetele tüvirakkudele (SSC). Küpsete spermide tootmine baseerub diferentseerumata A spermatogoonidel, mille arengujärgu esimeseks etapiks on A_s (*A-single*) spermatogoonid (Vergouwen jt., 1991; Nagano jt., 2000; McLean jt., 2003). A_s spermatogooniks nimetatakse tüvirakku, mis on sümmeetriliselt jagunedes võimeline ennast mitootiliselt taas tootma ja sellega spermatogoonset tüvirakkude populatsiooni säilitama või moodustama kaks A_{pr} (*A-paired*) spermatogooni. Samas eksisteerib ka spermatogoonsete tüvirakkude asümmeetrilise jagunemise näiteks äädikakärbse spermatogeneesis, mille tulemusena tekib ühest A_s spermatogoonist üks A_s ja üks A_{pr} spermatogoon (De Rooij, 1998; De Rooij, 2001; Cheng jt., 2008). Alates sellest staadiumist kuni spermideni jäävad kõik arenevad isassugurakud pärast jagunemisi üksteisega rakkudevaheliste sildade kaudu ühendatuks ning sellest tulenevalt toimub ka sugurakkude kaskaadne valmimine. A_{pr} spermatogoonid jagunevad edasi A_{al} (*A-aligned*) spermatogoonideks, mis jäävad ühendatuks neljakaupa ning võivad edasi jaguneda kuni 32 rakuks, jäädes rakkudevaheliste sildade kaudu ühendatuks (De Rooij, 1998; De Rooij, 2001). Järgnevalt diferentseeruvad A_{al} spermatogoonid A_1 spermatogoonideks. Vastavad spermatogoonid on hiires tuvastatavad vanuses P3–P6 (Drumond jt., 2011). A_1 spermatogoonid läbivad kuus mitoosiprotsessi, jagunedes edasi A_2 , A_3 , A_4 , A_{in} ning B spermatogoonideks. B spermatogoonid on ümara heterokromatiinirikka tuumaga rakud ning detekteeritavad hiires vanuses P8. B spermatogoonid, läbides hematotestikulaarse barjääri, jagunevad primaarseteks spermatotsüütideks, mis sisenevad umbes 10 päeva pärast isendi sünni meioosi esimesse jagunemisse (Bowels ja Koopman, 2007; Qian jt., 2014). Primaarsed spermatotsüüdid on detekteeritavad meioosi leptoteeni faasis vanuses P8–P10, sügoteeni faasis vanuses P12 ning ning pahhüteeni faasis vanuses P14–P20 (McLean jt., 2003; Phillips jt., 2010; Drumond jt., 2011). Meioosi esimeses profaasis toimub homoloogiliste kromosoomide ristsiire. Esimese meioosi lõpuks jäävad õdekromatiidid kokku ning moodustuvad sekundaarsed diploidsed spermatotsüüdid (Zamudio jt., 2008). Meioosi toimumise korrektsus sõltub oluliselt histoonide modifikatsioonist (Sasaki ja Matsui, 2008). Nimelt meioosis histoonid metüleeritakse ning deatsetüleeritakse, millega supresseeritakse spermatotsüütide globaalne geeniekspressioon (Li, 2002). Sekundaarsetest spermatotsüütidest arenevad meioosi teise jagunemise käigus ümmargused haploidsed spermatiidid, mis on detekteeritavad vanusest P20 (Phillips jt., 2010). Alates vanusest P20, kuni hiire suguküpsuse saabumiseni P30 arenevad spermiogeneesi käigus piklikud elongeerunud peaga spermatiidid, millel arenevad viburid. Tsükli lõpus vabanevad vääniliste seemnetorukeste valendikku sirpjad ning kondenseerunud tuumaga küpsed spermid.

Seega hiire isassugurakkude lõpliku valmimiseni toimub kokku 9-11 rakujagunemist (O'Donnell jt., 2011) (Joonis 2A ja 2B). Spermatiidi pea elongeerimise käigus asendatakse spermatiidide somaatilised histoonid protamiinide vastu, mis indutseerivad kromatiini kondenseerumist, muutes spermi pea hüdrodünaamilisemaks, mis võimaldab emassuguteedes paremini liikuda (Lewis jt., 2003; Zhao jt., 2005). Samuti võimaldavad protamiinid spermil DNA-d kompaktsemalt kokku pakkida ning sellest tingituna spermi geneetiliste info transkriptsioonilist vaigistamist (Miller jt., 2010). Samas jääb 15% DNA-st seotuks posttranslatsiooniliselt modifitseeritud histoonidega, mis on vajalik viljastumisel aktiivsete imprinditud geenide märgistamiseks (Braun, 2001; Godmann jt., 2009). Kromatiini kokkupakkimisele järgneb tsütoplasma sildade eemaldamine Sertoli rakkude poolt ning viburi ja hüdrolüütilisi ensüüme sisaldava akrosoomi moodustamine (Fawcett jt., 1959; Kimmins jt., 2007). Valminud spermid vabanevad Sertoli rakkude abil seemnetorukeste luumenisse ehk toimub spermiatsioon (Russell ja Clermont, 1976).

Postnataalse spermatogeneesi alguses muutub algne SSC-de populatsioon. Esimese spermatogeneesi tsükli ajal toimub laialdane spermatogoonide apoptoos. On leitud, et apoptoosi minevad spermatogoonid ekspresseerivad apoptootilist valku BAX (*BCL2-associated X protein*) ning arvatakse, et see võib olla vajalik Sertoli rakkude ja spermatogoonide vahelise suhtarvu säilitamiseks ning normaalse spermatogeneesi arenguks täiskasvanud organismis. Transgeensed hiired, kellel ekspresseeritakse sugurakkudes antiapoptootilist valku BCL2 (*B cell leukemia/lymphoma 2*) või üleekspresseeritakse samasse perekonda kuuluvat valku BCL-XL (*Bcl2l1 - BCL2-like 1*), on steriilsed. (Rodriguez jt., 1997)

Lisaks eelpool nimetatud spermatogeensetele rakkudele, sisaldavad väänilised seemnetorukesed tugi- ehk Sertoli rakke. Vääniliste seemnetorukeste basaalmembraaniga kontaktis olevad Sertoli rakud moodustavad hematotestikulaarse barjääri, mille funktsiooniks on kaitsta arenevaid spermatotsüüte ja spermatiide autoimmuunsete reaktsioonide eest (Walker ja Cheng, 2005). Sertoli rakud moodustavad spermatiididega ankurliiduseid ehk ektoplasmaatilisi spetsialiseerituspiirkondi (ES). ES piirkonna kaudu on ühenduses Sertoli rakk ja elongeeruv spermatiid, võimaldades viimasel liikuda läbi Sertoli raku epiteeli ja jõuda seemnetorukese luumenisse. ES koosneb heksagonaalselt pakitud aktiinifilamentidest, mis on surutud Sertoli raku plasmamembraani ja selle all oleva endoplasmaatilise retiikulumi vahele (Qian jt., 2014). Vastav piirkond seondab mikrotuubuleid ja mootorvalke (Guttman jt., 2000). Seega saab väita, et Sertoli rakud moodustavad „raja“, mis võimaldab spermatogeensetel rakkudel väänilise seemnetorukese basaalmembraanilt luumenisse jõuda. Erinevates arenguastmes spermatogeensed rakud asuvad kihiti Sertoli rakkude vahel ning nende areng

toimub seemnetorukese perifeeriast valendiku suunas. Muutused seemnetorukeste idu- ehk spermatogeense epiteeli kindlas paigas moodustavad spermatogeense epiteeli tsükli, mis koosneb eri rakkude arenguastmete spetsiifilisest kombinatsioonist ehk staadiumist. Näiteks hiirel eksisteerib spermatogeense epiteeli tsükli staadiume kaksteist (Hess ja Chen, 1992) (Joonis 2C).



Joonis 2. Spermatogeense epiteeli tsükli staadiumid. (A) Postnataalse spermatogeneesi käigus kujunevad spermatogoonsetest tüvirakkudest (SSC) elongeerunud spermatiidid. (B) Postnataalse spermatogeneesi käigus liiguvad spermatogeensed rakud vastavalt arengu staadiumile basaalmembraanilt luumeni suunas. (C) Rooma numbrid I-XII tähistavad spermatogeense epiteeli tsükli staadiume. Lühendid: A, A spermatogoonid; In, A_m spermatogoonid; B, B spermatogoonid; D, diploteeni staadiumis olevad spermatotsüüdid; Pl; preleptoteeni staadiumis olevad spermatotsüüdid; L; leptoteeni staadiumis olevad spermatotsüüdid; Z, zügoteeeni staadiumis olevad spermatotsüüdid; P, pahhüteeni staadiumis olevad spermatotsüüdid; 1–9, ümmargused spermatiidid; 10–12, varases elongatsioonis olevad spermatiidid; 13–14, hilises elongatsioonis olevad spermatiidid; 15–16 elongeerunud spermatiidid. Sertoli rakke (hallid klotsid) leidub igas spermatogeense epiteeli tsükli staadiumis (Terada jt., 2010 järgi).

Vääniliste seemnetorukeste sidekoelises seinas paiknevad peritubulaarsed rakud. Peritubulaarsed rakud on müoidsed rakud, mille funktsiooniks on tekitada peristaltika väänilistes seemnetoruketes, mille tulemusena mittemotiilsed elongeerunud spermid

vabanevad Sertoli rakkudest ning liiguvad munandimanusesse järelvalmima (Bressler ja Ross, 1972).

1.2.1. Spermiatsioon

Spermiatsiooniks nimetatakse elongeerunud spermatiidide vabanemist Sertoli rakkudest seemnetorukese valendikku. Hiirel algab spermiatsioon spermatogeneesi VII staadiumis ning lõpeb VIII staadiumis, kestes ligikaudu 82 tundi. Spermiatsiooni käigus toimuvad paragrahvis 1.2. kirjeldatud muutused spermatidi ehituses (transformatsioon), mille käigus moodustub ümarast spermatidist elongeerunud spermatiidid viburi, akrosoomi ning protamiinide poolt kokku pakitud DNAGA. Spermiatsiooni lõppedes fagotsüteerivad Sertoli rakud üleliigse spermatiidide tsütoplasma ning elongeerunud spermatiidid vabanevad seemnetorukeste valendikku. Selleks, et saaks toimuda spermatiidide vabanemine seemnetorukese luumenisse, toimub spermiatsiooni lõppfaasis ES piirkondade eemaldamine. Siiski on näidatud, et peale ES piirkondade eraldamist ja enne spermatiidide vabanemist luumenisse jäävad spermatiidid ja Sertoli rakk omavahel veel adhesioonsete liiduste kaudu ühendusse umbes 22,5 tunniks. (O'Donnell jt., 2011)

Spermiatsioonil moodustuvad hilise spermatidi peaosa ja Sertoli rakkude vahele 24 tubulobulbaarset kompleksi (TBC) (O'Donnell jt. 2011; Upadhyay jt., 2012). Kõige enam tekib neid väänilise seemnetorukese epiteeliaalse tsükli II-V staadiumites ning need resorbeeruvad tsükli VI-VII staadiumite tsükli ajal (Qian jt., 2014). TBC'd kujutavad endast elongeerunud spermatidi tsütoplasma väljasopistusi, mis invagineeruvad Sertoli rakkude tsütoplasmasse, moodustades silindrikujulise topeltemembraaniga tubulaarse struktuuri. Tuubul koosneb Sertoli raku plasmamembraanist ning selle vastas olevast tihedast spermatidi membraanist, mida ääristavad aktiinifilamendid (Upadhyay jt., 2012; Qian jt., 2014). Tubulaarsest osast struktuuri tipu poole jääb bulbaarne regioon, mida ümbritseb Sertoli raku endoplasmaatiline retiikulum ning klatriini sisaldav harjastega kaetud TBC lohk (*bristle-coated pit*) (Young jt., 2009). TBC'de vahendusel toimub spermatidi tsütoplasma ning Sertoli rakkude ja spermatiidide vahelise ES piirkonna eemaldamine (Sprando ja Russell, 1987; Guttman jt., 2004). Viimane võimaldab ES piirkonnal taastekkida (Guttman jt., 2004).

Spermiatsiooni arenedes pikeneb Sertoli raku apikaalne tsütoplasma, mis on vajalik elongeerunud spermatidi lükkamise luumenisse. Roti puhul on VII spermatogeneense epiteeli faasi lõpuks spermatidi tsütoplasma kondenseerunud ja ankurdatud Sertoli raku epiteelile ning sellest hetkest alates nimetatakse seda tsütoplasma sagaraks ning hiljem elongeerunud

spermatiidi täielikul eraldumisel jääkehaks (Sprando ja Russell, 1987; O'Donnell jt., 2011). Enne spermatiidide vabanemist valendikku on väikene osa Sertoli rakkude tsütoplasmast seostunud spermatiidi pea- ja vaheosaga (O'Donnell jt., 2011). Spermatogeense epiteeli tsükli VIII faasis toimub Sertoli rakkude poolt reguleeritud spermatiidide vabanemine vääniliste seemnetorukeste valendikku, kust alates nimetatakse neid küpseteks spermideks ehk spermatosoidideks. Peritubulaarsete rakkude tekitatud kontraktsioonid suunavad spermid edasi munandivõrku ja läbi selle munandimanusesse (Russell jt., 1989). Tsütoplasma jääkehad fagotsüteeritakse Sertoli rakkude poolt (Russell jt., 1989). Spermiatsiooni läbiviimiseks on olulisteks endokriinseteks regulaatoriteks folliikuleid stimuleeriv hormoon (FSH) ja androgeen. Katsed on näidanud, et eelpool nimetatud regulaatorite puudumine testistes ei võimalda eloneerunud spermatiididel eralduda Sertoli rakkudest (O'Donnell jt., 2009).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva bakalaureusetöö suuremaks eesmärgiks oli iseloomustada isasugurakkude spetsiifilist *Ric8* mutantset hiireliini *Stra8Cre^{+/-}Ric8^{lacZ/lox}* (edaspidi nimetatud *Stra8Ric8^{CKO}*) Kitsamateks eesmärkideks oli:

1. Välja selgitada RIC8 puudusest tingitud anatoomilised-morfoloogilised defektid täiskasvanud hiirte munandites
2. Välja selgitada, kas RIC8 puudus põhjustab häireid vääniliste seemnetorukeste rakkude populatsioonides

2.2. Materjal ja meetodid

2.2.1. Hiireliin *Stra8Ric8^{CKO}*

Käesolevas bakalaureusetöös on kasutatud isasugurakkude spetsiifilist konditsionaalset hiireliini *Stra8Ric8^{CKO}*, kus *Ric8* geen lülitatakse välja alates P3 arengustaadiumis spermatogoonidest (Sadate-Ngatchou jt., 2008). *Stra8Ric8^{CKO}* hiireliini saamiseks kasutati järgmiseid hiireliine:

1. *Stra8Cre^{+/-}* hiireliin, kus Cre-rekombinaasi ekspressioon on kontrollitud *Stra8* geeni promootori poolt (Sadate-Ngatchou jt., 2008).
2. *Ric8^{lacZ/+} lacZ knock-in* hiireliin, kus ühes *Ric8* alleelis 5 esimest eksonit on asendatud β -geo kassettiga (Tõnissoo jt., 2006).
3. *Ric8^{lox/lox}* hiireliin, kus märklaudgeeni *Ric8* on viidud loxP järjestused (Ruisu jt., 2013).

Kõikide hiireliinide puhul kasutati geneetilise taustaliinina C57Bl/6J hiiri (metsiktüüpi hiireliin, edaspidi *wt*). *Wt* hiireliini isaseid kasutati käesolevas töös ka kontrollgrupina.

Kõik bakalaureusetöös kasutatud katseloomad hoiti standardsetes tingimustes ning neile oli võimaldatud ööpäevaringselt vabalt kättesaadav puhas vesi ja toit (TÜMRI vivaarium). Bakalaureusetöös kasutatud katseloomad ohverdati vastavalt Euroopa Liidus kehtestatud nõuetele selleks luba (FELASA) omava spetsialisti poolt.

2.2.2. Hiirte genotüpiseerimine

Hiirte genotüübi kinnitamiseks võeti täiskasvanud loomal saba otsast eraldatud koematerjal, mis asetati 1.5ml tuubi põhja (Axygen). Koematerjal lüüsi 100µl-is lüüsilahuses (lüüsipuhver [180 mM Tris-HCl (pH 9.0); 20 mM (NH₄)₂SO₄; 0.02% Tween 20], deioniseeritud vesi (ddH₂O) ning proteinaas K (0,9 U) (Fermentas) üleöö 55°C juures. Seejärel lüsaadis sisalduv proteinaas K ensümaatiline aktiivsus inaktiveeriti, inkubeerides lahuseid 20 minutit 98°C juures. Lüüsumata koematerjal (luud ja karvad) tsentrifuugiti 16060 x g juures 10min , kasutades tsentrifuugi Eppendorf Biofuge Pico (Eppendorf). Lüüsitud koematerjalist saadud genoomset DNA materjali analüüsiti alleelspetsiifilise polümeraasi ahelreaktsiooniga (PCR). Vastavate geenialleelide genotüpiseerimiseks kasutati järgmisi praimereid:

Ric8^{lox/+}

riccregenoF: 5' - GGT AGG GCT CAA TGT TGG - 3'

riccregenoR: 5' - GCC AAA CAA TCT CTC GAA CC - 3'

Ric8^{LacZ/+}

LacZ300: 5' - CGCA TCG TAA CCG TGC ATC T - 3'

RicptggenoF: 5' - CTC TCC CAG CAT CCC TCA C - 3'

Ptgin1rev: 5' - CAC ACC CCA GCC GAG TTG - 3'

Stra8Cre^{+/-}

StraF1: 5' - CTT CCA CAC CCT CTT GCA AC - 3'

iCreR2: 5' - AAT CTT TCT GAC CCG GCA GA - 3'

PCR reaktsioonisegu maht oli 10µl ning koosnes: 1x B puhver (10mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl₂, 0,1mg/ml BSA) (Solis), 0,2mM dNTP, 2mM MgCl₂ (Fermentas), 0,3µM praimereid, 0,02U/µl Taq-polümeraas, 1µl DNA ja ddH₂O. Proovid kanti 1xTBEs (Tris-boraat-EDTA) valmistatud 1,5% agarosgeelile, kuhu lisati 7,5µl etiidiumbromiidi. DNA pikkusmarkerina kasutati 1kb või 100bp DNA Ladder'it (Solis).

PCR-i programmi tingimused *Stra8Cre^{+/-}*, *Ric8^{LacZ/+}* ja *Ric8^{lox/+}* genotüpiseerimiseks olid järgmised:

95°C	5 min	
95°C	30 s	} 32 tsüklit
58°C	40 s	
72°C	1 min	
72°C	10 min	

2.2.3. Parafiinilõikude valmistamine

Isaste hiirte testised dissekteeriti jahedas 1x PBS-is ja fikseeriti 12 tundi 4% paraformaldehüüd (PFA)/PBS-is 4°C juures. Järgnevalt dehüdreeriti koed kasvava kontsentratsiooniga etanoolireas (vastavalt 50%, 70%, 80%, 90%, 96% ja 2 x 100 %) kõikides lahustes üleöö 4°C juures. Veetustatud materjal töödeldi 2 korda 2 tundi ksüleenis toatemperatuuril. Seejärel asetati mõningate ksüleeni jääkidega koematerjal 1 tunniks parafiini, järgnevalt inkubeeriti 3 tundi puhtas parafiinis. Parafiinivanne hoiti termostaadis 65°C temperatuuril. Koematerjal sisestati parafiiniga parafiiniblokki ning asetati tahenema külmaplaadile. Parafiinblokke säilitati kuni lõikamiseni toatemperatuuril.

Testistest tehti 7µm paksused parafiinlõigud transversaalses tasapinnas, kasutades mikrotoomi Microm HM 355s (Thermo Scientific). Parafiinlõigud asetati alusklaasidele (SuperFrost Plus, Thermo scientific) ning säilitati kuni histoloogiliste preparaate valmistamiseni toatemperatuuril.

2.2.4. Histoloogiliste preparaate valmistamine

Parafiinlõikude paremaks kinnitumiseks alusklaasidele hoiti neid 30 minutit 60°C juures. Preparaadid deparafineeriti ksüleeniga 2 korda 5 minutit ning rehüdreeriti, kasutades alaneva kontsentratsiooniga (96%, 90%, 80%, 70% ja 50%) etanoolirida. Igat lahjendust hoiti 2 minutit ning pesti ddH₂Oga. Seejärel värviti 10 minutit hematoksüliiniga tuumade ilmestamiseks. Värv fikseerimiseks hoiti lõike 10 minutit filtreeritud sooja kraanivees. Tsütoplasma ilmestamiseks värviti preparaate 1–2 minutit eosiiniga (Reahim), millele järgnes värvi fikseerimine 10 minuti jooksul filtreeritud sooja kraanivees. Preparaadid dehüdreeriti mõnekümne sekundi jooksul tõusva kontsentratsiooniga alkoholireas (70%, 80%, 90%, 96%,

100%) ja ksüleeni (1–2 minutit) abil. Koelõigud sulundati Kanada balsami (Sigma-Aldrich) abil.

2.2.5. Preparaatide pildistamine

Testiste püsipreparaatide vaatlemiseks ja pildistamiseks kasutati mikroskoopi Olympus BX51, mis on varustatud kaameraga Olympus DP71. Pildipaneelide koostamiseks kasutati Adobe Photoshop CS6 tarkvara.

2.2.6. Vääniliste seemnetorukeste defektide hindamine

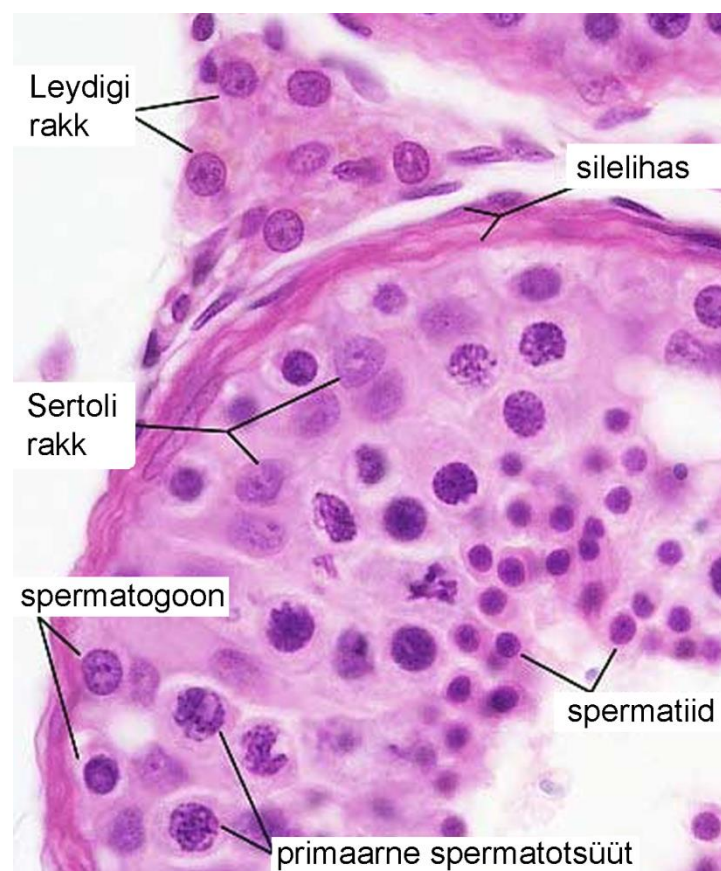
RIC8 puudusest tingitud anatoomilised-morfoloogiliste defektide hindamiseks kasutati hematoksüliini ja eosiniga värvitud preparaate (§ 2.2.4.). Iga ohverdatud isendi kohta (vastavalt *Stra8Ric8^{CKO}* n=10 ja *wt* n=10 looma) analüüsiti viit juhusliku 7 µm paksust ristlõiku testiste keskosast ning detekteeriti ja loendati visuaalsel vaatlusel defektsed väänilised seemnetorukesed ning jaotati need fenotüübi alusel 5 erinevasse kategooriasse. Lisaks loendati ka kõik antud lõigul olevad väänilised seemnetorukesed. Seejärel arvutati defektsete vääniliste seemnetorukeste osakaal antud testiselõigus. Selleks jagati vastavalt defekti tüübile ühel ristlõigul olevad defektid (näiteks tüüp 1 defektid) vääniliste seemnetorukeste üldarvuga, millest saadi vastava defekti osakaal ristlõigus. Seejärel summeeriti saadud andmed vastavalt katseloomade genotüübile ning arvutati keskmised väärtused.

Lisaks võrreldi defektsete vääniliste seemnetorukeste osakaalu eraldi noorte (P90) *Stra8Ric8^{CKO}* n=7 ja *wt* n=5 ja vanade (P180–P270) *Stra8Ric8^{CKO}* n=3 ja *wt* n=5 testistes. Samuti võrreldi omavahel vastavalt noori (P90) ja vanu (P180–P270) *wt* ning *Stra8Ric8^{CKO}* loomade testiseid.

2.2.7. Väänilistes seemnetorukestes olevate spermatogeensete rakkude loendamine

Vääniliste seemnetorukeste rakkude loendamisel kasutati eosiini ja hematoksüliiniga värvitud preparaate. Vastavate rakkude loendamisel valiti isendi (vastavalt *Stra8Ric8^{CKO}* n=10 ja *wt* n=10 looma) kohta kolm juhuslikku ristlõiku väänilisest seemnetorukesest (väänilised seemnetorukesed olid valitud nii, et need oleksid epiteliaalse tsükli VII-IX staadiumis).

Väänilistes seemnetorukestes olevad rakud kategoriseeriti järgnevalt: spermatogoonid, spermatotsüüdid, ümmargused spermatiidid, elongeerunud spermatiidid ja Sertoli rakud. Väänilistes seemnetorukestes olevaid rakke loendati järgnevalt: vääniline seemnetoruke jaotati neljaks võrdseks sektoriks ning loeti ühes sektoris eraldi igasse kategooriasse kuuluvad rakud (Joonis 3). Hiljem korrutati saadud arv neljaga. Lisaks võrreldi väänilistes seemnetorukestes olevate rakkude arvu eraldi eraldi noorte (P90) *Stra8Ric8^{CKO}* n=7 ja wt n=5 ja vanade (P180–P270) *Stra8Ric8^{CKO}* n=3 ja wt n=5 isendite testistes ning võrreldi ka omavahel vastavalt noorte (P90) ja vanade (P180–P270) wt ning *Stra8Ric8^{CKO}* loomade spermatogeense epiteeli rakkude arvu.



Joonis 3. Väänilistes seemnetorukestes paiknevate rakkude fenotüüp. Spermatogoonid on suured ümmargused või ovaalsed kondenseerunud kromatiiniga rakud. Primaarsed spermatotsüüdid on mõõtmelt spermatogoonidest suuremad, neis on tuvastatav palju tsütoplasmat, suur tuumake ning kromatiininiidid. Spermatiidid on ümmargused, mõõtmelt spermatogoonidest väiksemad rohkem kondenseerunud ja vähem granulaarse tuumakesega rakud. Sertoli rakud paiknevad iduepiteelirakkude vahel, algavad laia alusega basaalmembraanilt ning ulatuvad seemnetorukese valendikuni. Sertoli rakud on disperseerunud kromatiiniga ja rohke tsütoplasмага (Burkitt, H., G. jt., 1993 järgi).

2.2.8. Statistiline analüüs

Statistiliseks analüüsiks kasutati Excel 2013 (Microsoft) programmi. Statistilise olulisuse hindamiseks kasutati Student'i t-testi ning statistiliselt oluliseks loeti tulemused, mille olulisuse nivoo $p \leq 0,05$.

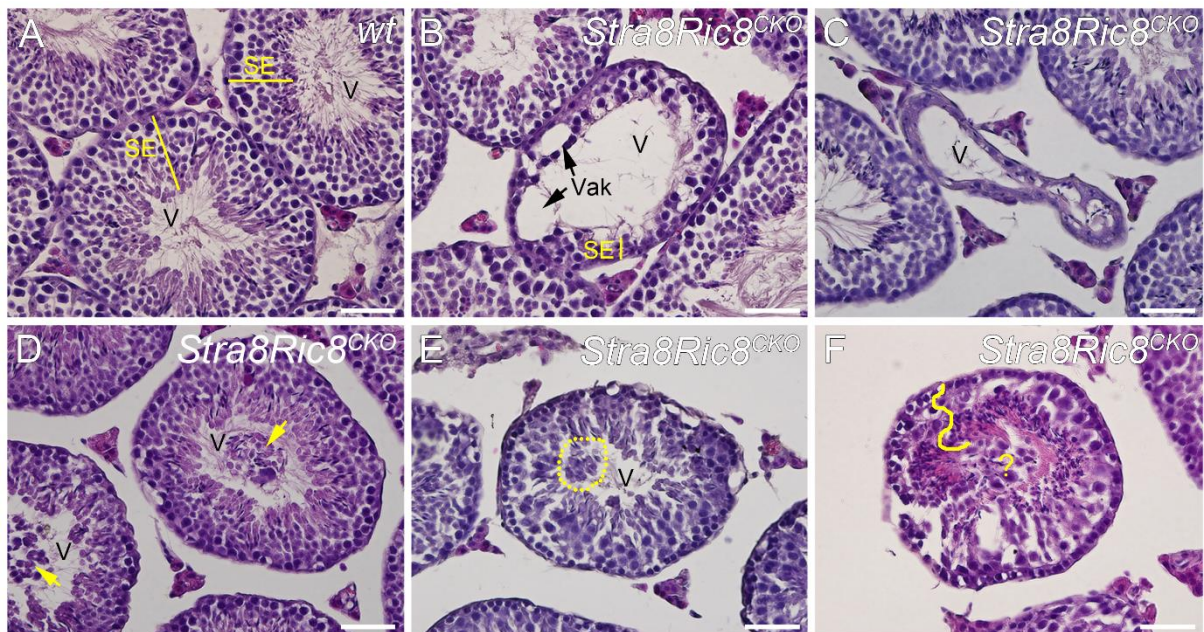
2.3. Tulemused

2.3.1. RIC8 puudusest tingitud anatoomilised-morfoloogilised defektid munandites

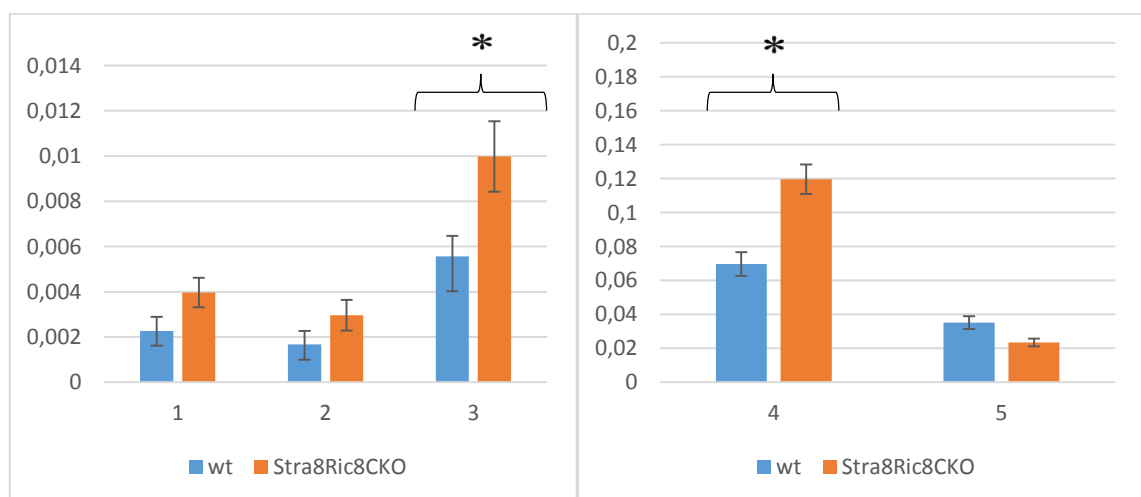
Kirjeldamaks RIC8 puudusest tingitud anatoomilisi-morfoloogilisi võimalikke defekte munandites, tehti *Stra8Ric8^{CKO}* (n=10) ning kontrollina kasutatud C57Bl/6J (n=10) hiirte munanditest eosini ja hematoksüliiniga värvitud histoloogilised preparaadid. Vastavalt vääniliste seemnetorukeste defektidele jaotati anatoomilised-morfoloogilised kõrvalekalded viide erinevasse tüüpi:

1. Laienenud valendikuga, väga õhuke spermatogeenne epiteel mitmete vakuoolidega (Joonis 4B);
2. Nekrootilised väänilised seemnetorukesed (Joonis 4C);
3. Spermatogeense epiteeli rakkude esinemine väänilise seemnetorukese valendikus (Joonis 4D);
4. Ümmargustest spermatiididest koosnevate üksikute kobarate esinemine vääniliste seemnetorukeste valendiku äärealadel (Joonis 4E).
5. Spermatogeense epiteeli ebakorrektnel struktuur (Joonis 4F)

Eelpool loetletud defektide esinemissageduse statistiline analüüs näitas, et oluline ($p \leq 0,05$) erinevus *wt* (n=10) ja *Stra8Ric8^{CKO}* (n=10) testistes ilmnes eelkõige spermatogeense epiteeli rakkude (spermatogoonid, ümarad spermatiidid, spermatotsüüdid; tüüp 3 defekt) esinemise sageduses väänilise seemnetorukese valendikus. *Stra8Ric8^{CKO}* loomadel esines sellist defekti märgatavalt rohkem (6% kõigist uuritud vääniliste seemnetorukeste defektidest; 1% kõigist antud isendil loendatud väänilistest seemnetorukestest) kui kontrollloomadel (4% kõigist uuritud vääniliste seemnetorukeste defektidest; 0,5% kõigist antud isendil loendatud väänilistest seemnetorukestest) (Joonis 4D; Joonis 5). *Stra8Ric8^{CKO}* loomade (n=10) väänilistes seemnetorukestes oli ka nn. rakukobaraid (tüüp 4) valendiku servaalal oluliselt ($p < 0,05$) rohkem (*Stra8Ric8^{CKO}* 65% (11,4% kõigist seemnetorukestest) ja *wt* vastavalt 52% (7% kõigist seemnetorukestest) kogu defektidest) täheldatavad kui *wt* (n=10) kontrollidel (Joonis 4E; Joonis 5).



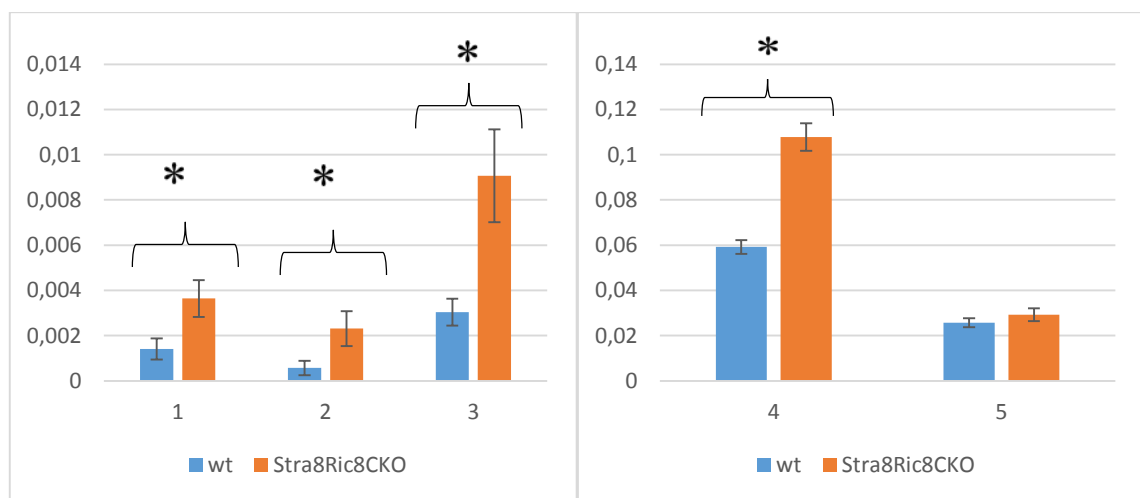
Joonis 4. Defektid väänilistes seemnetoruketes. (A) Etalonina kasutatav *wt* kontrollisase testise väänilised seemnetorukesed, mis on ümmarguse ühtlase kujuga, selgesti eristuva valendiku ja spermatogeense epiteeliga (kollane kriips). (B) Laienenud valendikuga, õhuke spermatogeenne epiteel (kollane kriips) iseloomulike suurte vakuoolidega (tüüp 1 defekt). (C) Nekrootiline (atroofiline) vääniline seemnetoruke, kus enamus spermatogeensetest rakkudest hävinud (tüüp 2 defekt) (D) Spermatogeense epiteeli rakud (enamasti spermatotsüüdid, ümarad spermatiidid; kollane nooleots) väänilise seemnetorukese valendikus (tüüp 3 defekt). (E) Ümmargustest spermatiididest koosnevate üksikute kobarate (kollane punktiir) esinemine vääniliste seemnetorukete valendiku äärealadel (tüüp 4 defekt). (F) Spermatogeense epiteeli ebastandardne lainjas/väändunud struktuur (kollane kõverjoon), valendiku osa ei ole selgelt määratletav (küsimärk) (tüüp 5 defekt). Lühendid: SE, spermatogeenne epiteel; V, valendik; Vak, vakuool. Mõõtkava pildidel 50µm.



Joonis 5. Defektsete vääniliste seemnetorukete võrdlus wt ning Stra8Ric8CKO isendite vahel. Graafikul on välja toodud vääniliste seemnetorukete defektide esinemissagedused (vastavalt defekti tüübile defektid jagatuna vääniliste seemnetorukete üldarvuga, millest saadi vastava defekti osakaal ristlõigis). Kontrolltestiseid oli n=10

ja *Stra8Ric8CKO* testised n=10. Tähised: 1, tüüp 1 defekt; 2, tüüp 2 defekt; 3, tüüp 3 defekt; 4, tüüp 4 defekt; 5, tüüp 5 defekt. Tärniga on märgitud Student t-testiga leitud statistiline olulisus $p<0,05$.

Võrreldes omavahel *wt* ja *Stra8Ric8^{CKO}* genoomiga noori (P90) isendeid, selgus, et statistiliselt olulised defektid vastavates testistes olid nekrootilised/atreetilised väänilised seemnetorukesed (tüüp 2) ($p<0,05$), spermatogeense epiteeli rakkude esinemine väänilise seemnetorukese luumenis (tüüp 3) ($p<0,05$) ja õhukese spermatogeense epiteeli ja laienenud valendikuga seemnetorukeste esinemine (tüüp 1) ($p<0,05$), mida esines *Stra8Ric8^{CKO}* loomadel märgatavalt rohkem (Joonis 6). Lisaks oli *Stra8Ric8^{CKO}* loomadel märkimisväärselt kõrgem ka ümmargustest spermatotsüütidest koosnevate kobarate esinemine vääniliste seemnetorukeste luumeni äärealadel ($p<0,05$), moodustades defektsetest seemnetorukestest *wt* isenditel 57% ja *Stra8Ric8^{CKO}* genoomiga isenditel 64% (Joonis 6). Samas nõ. ebastandardse spermatogeense epiteeli struktuuriga väänilisi seemnetorukesi oli mõlema genotüübi puhul sarnase sagedusega (Joonis 6).

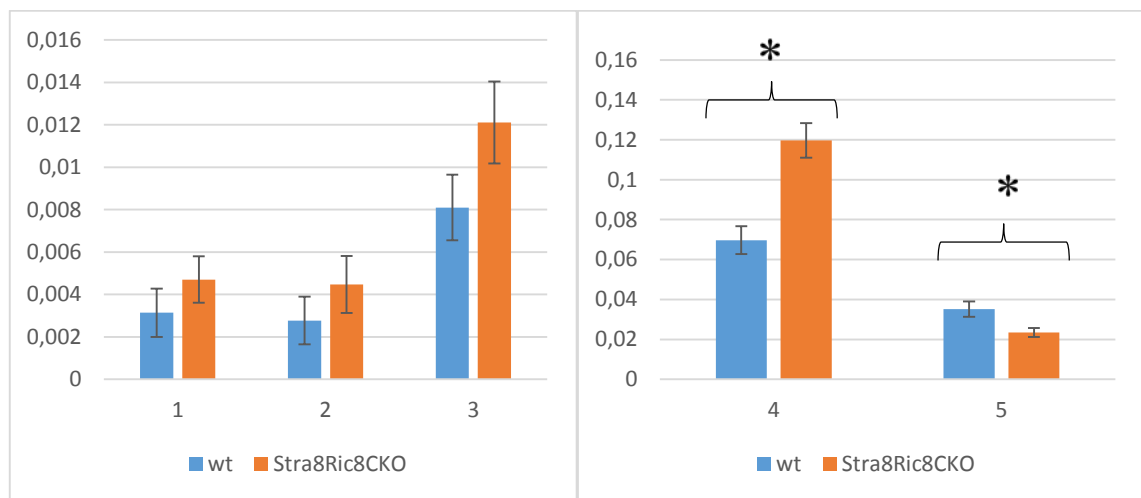


Joonis 6. Defektsete vääniliste seemnetorukeste võrdlus noorte P90 *wt* ja *Stra8Ric8CKO* isendite vahel.

Graafiku vertikaalteljel on välja toodud vääniliste seemnetorukeste defektide esinemissagedused (vastavalt defekti tüübile on defektid jagatud vääniliste seemnetorukeste üldarvuga, millest saadi vastava defekti osakaal ristlõigis). Kontrolltestiseid oli n=3 ja *Stra8Ric8CKO* testised n=7. Tähised: 1, tüüp 1 defekt; 2, tüüp 2 defekt; 3, tüüp 3 defekt; 4, tüüp 4 defekt; 5, tüüp 5 defekt. Tärniga on märgitud Student t-testiga leitud statistiline olulisus $p<0,05$.

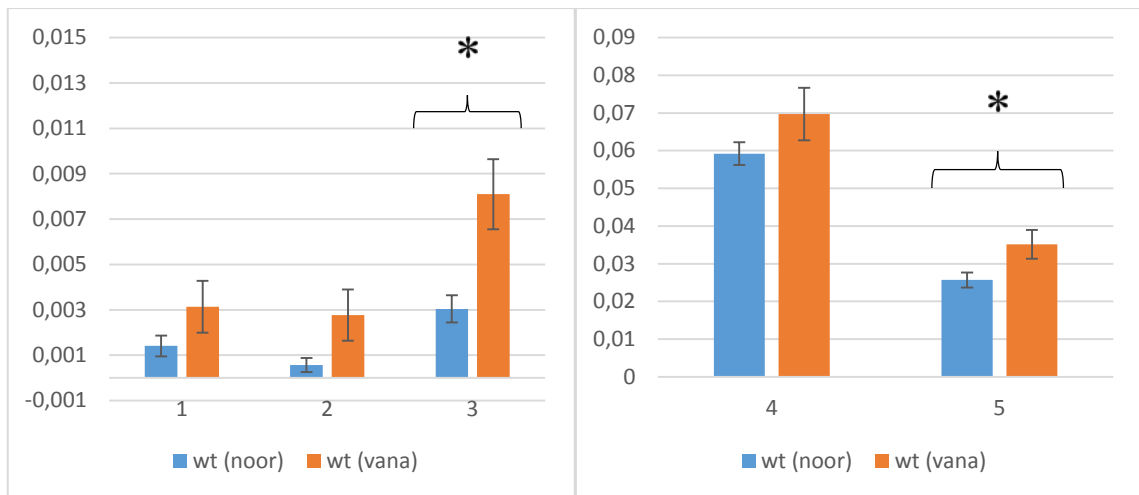
Võrreldes vanemate (P180-270) *wt* ja *Stra8Ric8^{CKO}* isendite vääniliste seemnetorukeste fenotüüpe, leiti üllatuslikult oluliseks ($p<0,05$) erinevuseks kahe genotüübi vahel tüüp 5 defekti alla liigituvat spermatogeense epiteeli ebakorrektselt struktuuri sagedasemat esinemist just *wt*

vanematel loomadel (Joonis 7), moodustades nendel defektsetest seemnetorukestest vastavalt 24% (*Stra8Ric8^{CKO}* loomadel oli see vastavalt 13%). Lisaks leiti, et statistiliselt märkimisväärne ($p < 0,05$) erinevus oli tüüp 4 defektile iseloomulike ümmargustest spermatiididest koosnevate üksikute kobarate esinemine vääniliste seemnetorukeste valendiku äärealadel, eelkõige *Stra8Ric8^{CKO}* vanadel hiirtel (Joonis 7). Selline defekt moodustab *wt* isenditel 48% ja *Stra8Ric8^{CKO}* genoomiga isenditel lausa 66% defektsetest väänilistest seemnetorukestest (Joonis 7).

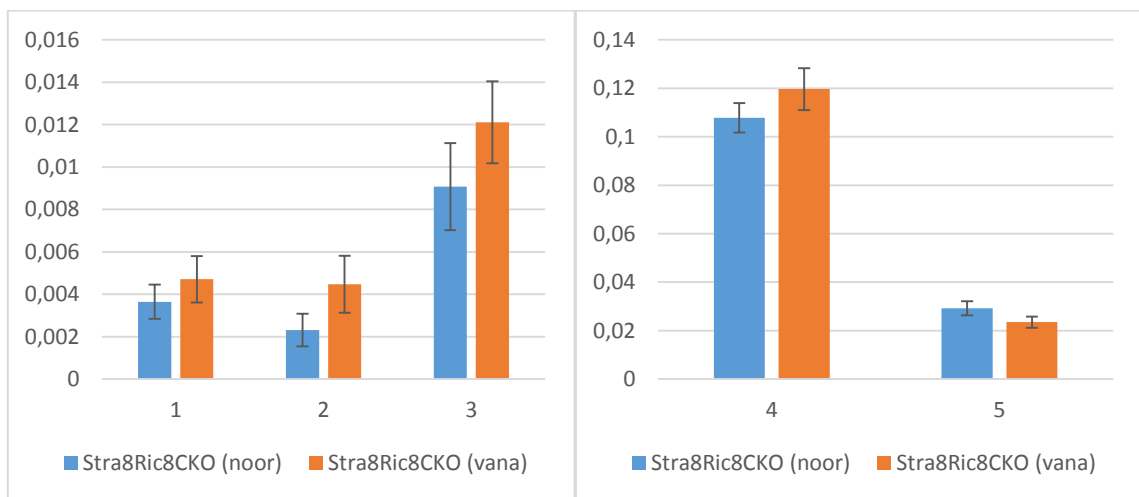


Joonis 7. Defektsete vääniliste seemnetorukeste võrdlus vanade (P180-270) *wt* ja *Stra8Ric8^{CKO}* testistes. Graafikul on välja toodud vääniliste seemnetorukeste defektide esinemissagedused. Kontrolltestiseid oli $n=5$ ja *Stra8Ric8^{CKO}* testised $n=3$. Tähisted: 1, tüüp 1 defekt; 2, tüüp 2 defekt; 3, tüüp 3 defekt; 4, tüüp 4 defekt; 5, tüüp 5 defekt. Tärniga on märgitud Student t-testiga leitud statistiline olulisus $p < 0,05$.

Lisaks võrreldi omavahel noorte ja vanemate *wt* isendite defektseid väänilisi seemnetorukesti. Leiti, et vanematel loomadel esines märgatavalt rohkem ($p < 0,05$) spermatogeense epiteeli rakkude esinemist vääniliste seemnetorukeste valendikes (tüüp 3 defekt) ning samuti oli rohkem häiritud spermatogeense epiteeli struktuur (tüüp 5 defekt) (Joonis 8). Tüüp 3 moodustab teistest defektsetest vääniliste seemnetorukestest noorematel *wt* loomadel 3% ning vanematel katsehiirtel vastavalt 6%. Spermatogeense epiteeli ebakorrektn struktuur moodustab kõikidest defektsetest väänilistest seemnetorukestest noorematel 25% ja vanematel 24% (Joonis 8). Sarnane võrdlusanalüüs noorte ja vanade *Stra8Ric8^{CKO}* loomade vahel statistilisi erinevusi kahe grupi vahel ei näidanud (Joonis 9).



Joonis 8. Defektsete vääniliste seemnetorukeste võrdlus noorte (P90) ja vanade (P180-270) *wt* isendite vahel. Graafikul on välja toodud vääniliste seemnetorukeste defektide esinemissagedused. Noori oli n=5 ja vanu n=5. Tähisted: 1, tüüp 1 defekt; 2, tüüp 2 defekt; 3, tüüp 3 defekt; 4, tüüp 4 defekt; 5, tüüp 5 defekt. Tärniga on märgitud Student t-testiga leitud statistiline olulisus $p < 0,05$.

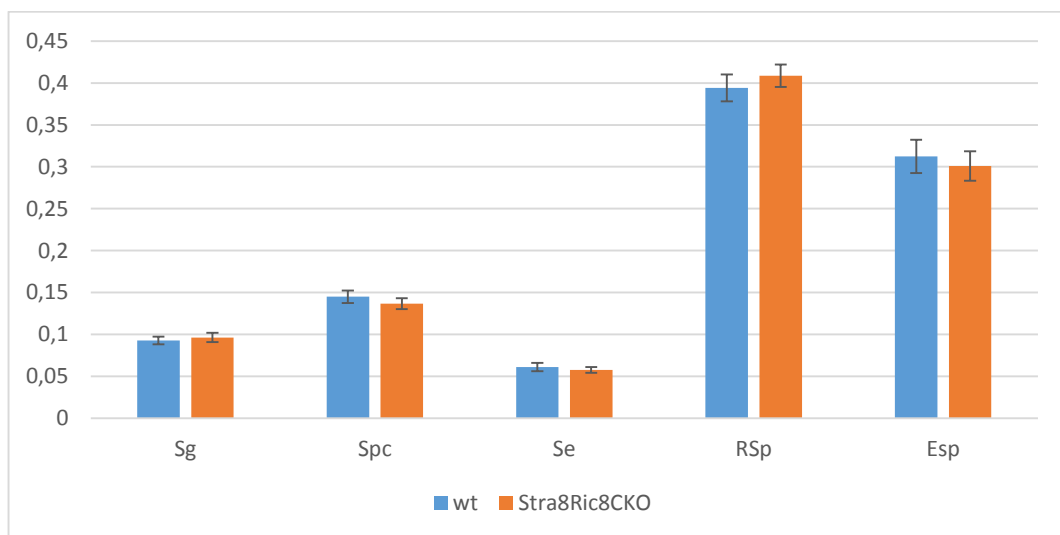


Joonis 9. Defektsete vääniliste seemnetorukeste võrdlus noorte (P90) ja vanade (P180-270) *Stra8Ric8^{CKO}* isendite vahel. Graafikul on välja toodud vääniliste seemnetorukeste defektide esinemissagedused. Noori oli n=7 ja vanu n=3. Tähisted: 1, tüüp 1 defekt; 2, tüüp 2 defekt; 3, tüüp 3 defekt; 4, tüüp 4 defekt; 5, tüüp 5 defekt. Tärniga on märgitud Student t-testiga leitud statistiline olulisus $p < 0,05$.

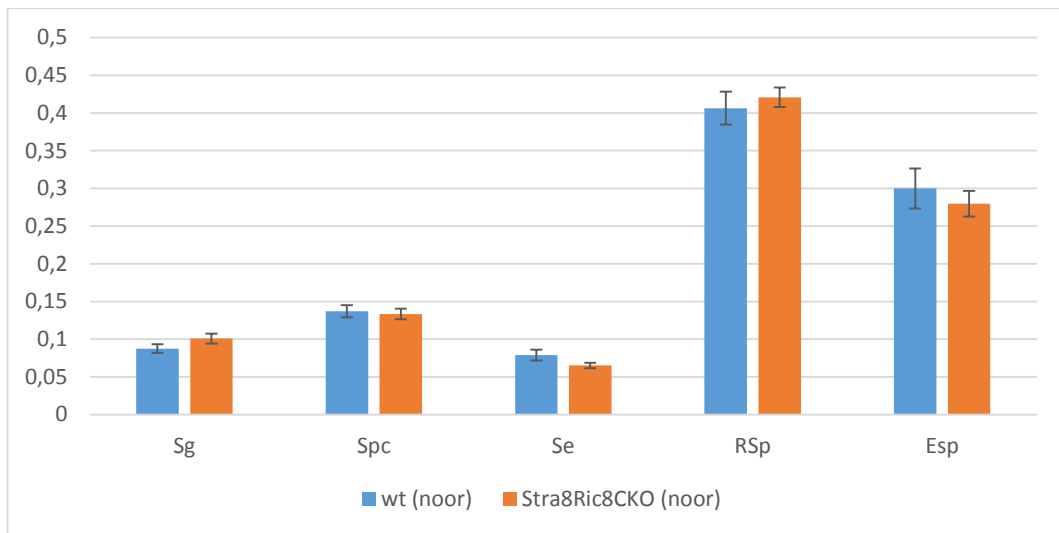
2.3.2. Väänilistes seemnetorukestes olevate rakkude populatsioonid

Täiskasvanud, suguküpsede katsehiirte munandites spermatogeense epiteeli tsükli staadiumis VII-XI (Joonis 2) olid silmaga eristatavad järgmised spermatogeensed rakud: spermatogoonid, spermatotsüüdid, Sertoli rakud, ümmargused ning elongeerunud spermatiidid.

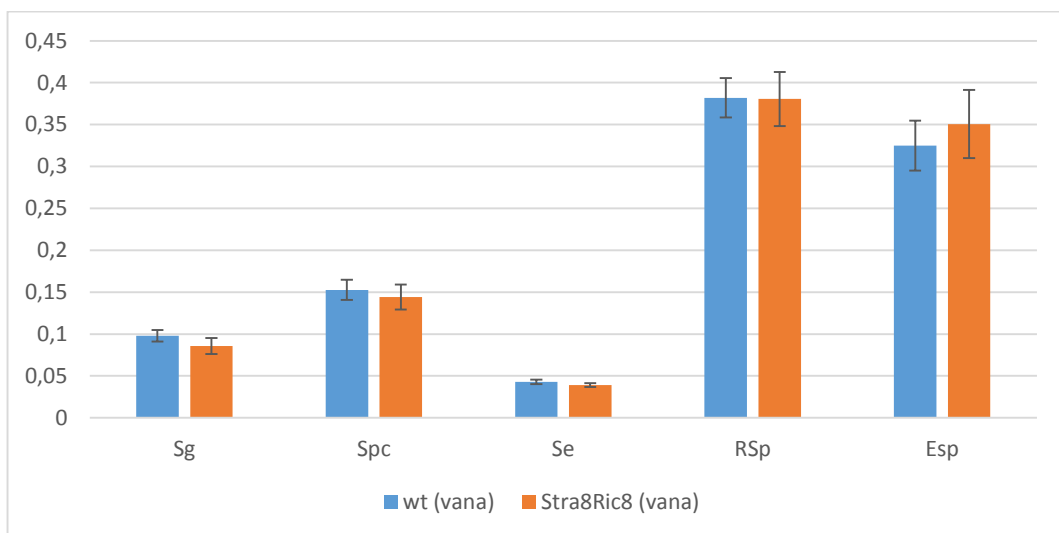
Täiskasvanud *wt* isashiirte (n=10) väänilistes seemnetorukestes moodustavad spermatogoonid 9,3% ($0,093 \pm 0,004$), spermatotsüüdid 14,5% ($0,145 \pm 0,008$), Sertoli rakud 6,1% ($0,06 \pm 0,005$), ümmargused spermatiidid 39,4% ($0,394 \pm 0,015$) ning elongeerunud spermatiidid 31,2% ($0,312 \pm 0,02$) ja keskmiselt on rakke kokku 416. *Stra8Ric8^{CKO}* loomadel (n=10) moodustavad spermatogoonid vastavalt 9,6% ($0,096 \pm 0,005$), spermatotsüüdid 13,7% ($0,137 \pm 0,007$), Sertoli rakud 5,7% ($0,057 \pm 0,003$), ümmargused spermatiidid 41% ($0,409 \pm 0,013$), elongeerunud spermatiidid 30,1% ($0,301 \pm 0,02$) vääniliste seemnetorukestes olevatest rakkudest ning keskmiselt on väänilises seemnetorukeses kokku 365 rakku. Võrreldes *wt* ja *Stra8Ric8^{CKO}* isendite spermatogeensete rakkude populatsioone omavahel, leiti et need statsitliselt oluliselt ei erine genotüüpide vahel (Joonis 10). Sarnaselt ei eksisteerinud märkimisväärsed erinevusi ka eraldi võetuna noorte (P90) ning vanade (P180-270) *wt* ning *Stra8Ric8^{CKO}* loomade vahel (Joonis 11 ja 12).



Joonis 10. Vääniliste seemnetorukeste rakkude võrdlus *wt* ja *Stra8Ric8^{CKO}* isendite vahel. Võrreldes t-testiga *wt* ja *Stra8Ric8^{CKO}* isendite rakkude alampopulatsioone väänilistes seemnetorukestes, selgus, et katseisendite vahel statistiliselt olulisi erinevusi ei esine. Lühendid: Sg, spermatogoon; Spc, spermatotsüüt; Se, Sertoli rakk; RSp, ümmargune spermatiid; Esp, elongeerunud spermatiid.



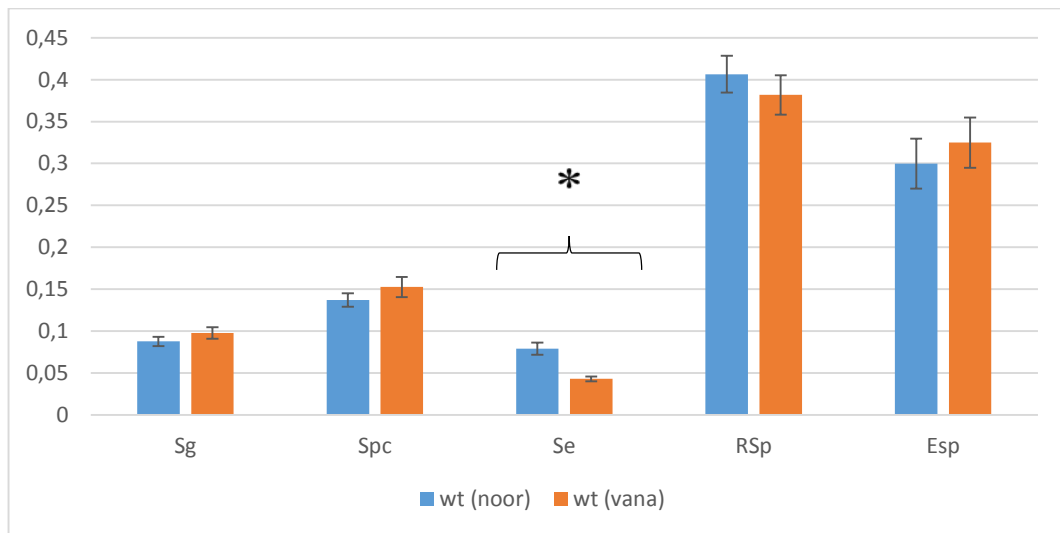
Joonis 11. Vääniliste seemnetorukeste rakkude populatsioonide võrdlus noorte (P90) *wt* ja *Stra8Ric8^{CKO}* loomade vahel. Lühendid: Sg, spermatogoon; Spc, spermatotsüüt; Se, Sertoli rakk; RSp, ümmargune spermatiid; ESp, elongeerunud spermatiid.



Joonis 12. Vääniliste seemnetorukeste rakkude võrdlus vanade (P180-270) *wt* ja *Stra8Ric8^{CKO}* isendite vahel. Võrreldes t-testiga vanemate mutantsete (n=2) ja *wt* (n=5) loomade väänilistes seemnetoruketes olevate rakkude populatsioone, ei eksisteeri statistilist olulisust. Lühendid: Sg, spermatogoon; Spc, spermatotsüüt; Se, Sertoli rakk; RSp, ümmargune spermatiid; ESp, elongeerunud spermatiid.

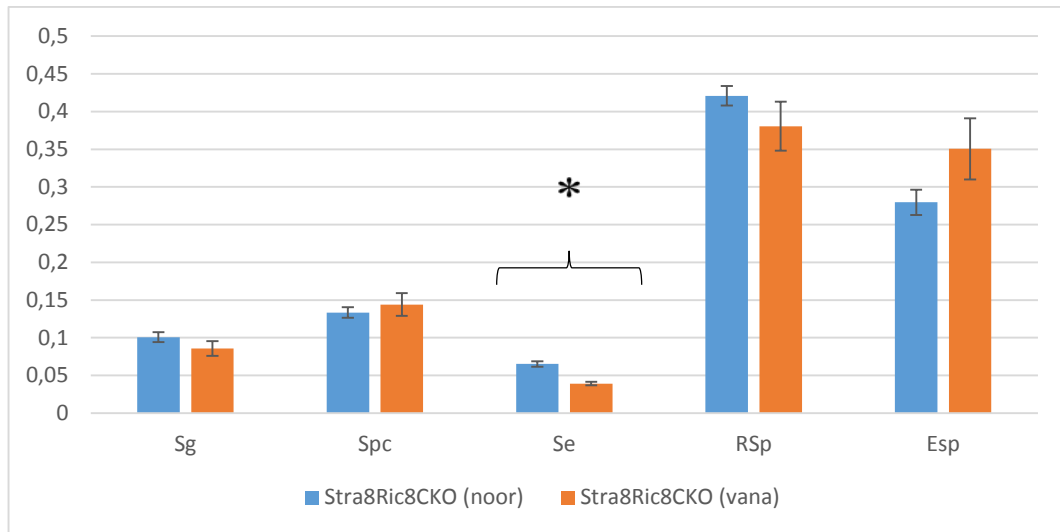
Lisaks vaadati eraldi *wt* noori ja vanu (P180-270) isendeid, ning leiti, et noortes *wt* loomades moodustavad spermatogoonid 8,8% ($0,088 \pm 0,0056$), spermatotsüüdid 13,7% ($0,137 \pm 0,008$), Sertoli rakud 7,9% ($0,0789 \pm 0,007$), ümmargused spermatiidid 40,6% ($0,406 \pm 0,021$) ning elongeerunud spermatiidid 30% ($0,30 \pm 0,03$) väänilistes seemnetoruketes olevatest rakkudest. Noortel *wt* hiirtel on keskmiselt ühe väänilise seemnetorukese kohta 395 rakku. Samas vanadel

wt isenditel moodustavad spermatogoonid 9,8% ($0,098 \pm 0,007$), spermatotsüüdid 15,3% ($0,153 \pm 0,012$), Sertoli rakud 4,3% ($0,043 \pm 0,003$), ümmargused spermatiidid 38,2% ($0,382 \pm 0,024$) ning eloneerunud spermatiidid 32,5% ($0,325 \pm 0,03$) väänilistes seemnetorukestes olevatest rakkudest. Vanades *wt* isendites on ühe väänilise seemnetorukese kohta 438 rakku. Oluliseks erinevuseks noorte ja vanade kontrollhiirte vahel oli Sertoli rakkude arv, mis vananedes märkimisväärselt väheneb 46% ($p < 0,05$) (Joonis 13).



Joonis 13. Vääniliste seemnetorukeste rakkude võrldus noorte (P90) ja vanade (P180-270) *wt* isendite vahel. Võrreldes t-testiga noorte ($n=5$) ja vanade ($n=5$) *wt* isendite rakkude populatsiooni erinevust, on statistiliselt erinev Sertoli rakkude populatsioon (* $p < 0,05$). Lühendid: Sg, spermatogoon; Spc, spermatotsüüt; Se, Sertoli rakk; RSp, ümmargune spermatiid; Esp, eloneerunud spermatiid.

Analoogne analüüs *Stra8Ric8^{CKO}* loomadega näitas, et noortes (P90) hiirtes moodustavad väänilistes spermatogoonides olevatest rakkude populatsioonidest spermatogoonid 10% ($0,1 \pm 0,007$), spermatotsüüdid 13,3% ($0,133 \pm 0,007$), Sertoli rakud 6,52% ($0,0652 \pm 0,004$), ümmargused spermatiidid 42,1% ($0,421 \pm 0,013$), eloneerunud spermatiidid 28% ($0,28 \pm 0,017$). Toetudes statistikale, on ühe noore *Stra8Ric8^{CKO}* isendi väänilises seemnetorukeses 351 rakku. Vanades (P180-270) mutantsetes isendites moodustavad spermatogoonid vastavalt 8,6% ($0,086 \pm 0,01$), spermatotsüüdid 14,4% ($0,144 \pm 0,015$), Sertoli rakud 4% ($0,04 \pm 0,002$), ümmargused spermatiidid 38% ($0,38 \pm 0,032$), eloneerunud spermatiidid 35,1% ($0,351 \pm 0,041$). Vanades mutantsetes isendites on ühe väänilise seemnetorukese kohta 396 rakku. Sarnaselt *wt* loomadega on ka *Stra8Ric8^{CKO}* genotüübiga hiirtel vananedes vähenenud (40%) Sertoli rakkude populatsioon väänilises seemnetorukeses ($p < 0,05$) (Joonis 13 ja 14).



Joonis 14. Vääniliste seemnetorukeste rakkude võrdlus noorte (P90) ja vanade (P180-270) *Stra8Ric8^{CKO}* isendite vahel. Võrreldes t-testiga noorte (n=7) ja vanade (n=3) mutantsete isendite erinevusi vääniliste seemnetorukeste rakkude populatsioonides, on statistiliselt oluliseks erinevuseks Sertoli rakkude populatsioon (*p<0,05). Lühendid: Sg, spermatogoon; Spc, spermatotsüüt; Se, Sertoli rakk; RSp, ümmargune spermatiid; Esp, elongeerunud spermatiid.

2.4. Arutelu

Käesolevas bakalaureusetöös analüüsiti RIC8 ja gametogeneesi vahelisi seoseid varasemalt Tartu Ülikooli arengubioloogia õppetooli laborimeeskonna poolt loodud *Stra8Ric8^{CKO}* hiireliini põhjal. *Stra8* promootori kontrolli all olev Cre-rekombinaas lõikas spetsiifiliselt loxP saitide vahel oleva guaniini nukleotiidivahetusfaktori *Ric8* geeni esimesed eksonid. *Stra8-iCre* ekspressioon algab hiirel arengupäevast P3, mil lõppeb gonotsüütide migreerumine väänilise seemnetorukese basaalmembraanile ning algab As spermatogoonide diferentseerumine ning kestab kuni preleptoteeni spermatotsüütide staadiumini (Bao jt., 2013; Sadate-Ngatchou jt., 2008).

Spermatogoonide, spermatotsüütide ja spermatiidide koguarvus olulisi erinevusi *Stra8Ric8^{CKO}* ja *wt* loomadel ei täheldatud. Kuna RIC8 on oluline faktor asümmeetrilise/sümmeetrilise jagunemise juures (Miller ja Rand, 2000; Afshar jt., 2004; Couwenbergs jt., 2004; Afshar jt., 2005; David jt., 2005; Hampoelz jt., 2005; Wang jt., 2005; Woodard jt., 2010), siis võib eeldada, et ka spermatogeneesi meiotootilises jagunemises võib olla häireid. Kuna antud töös ei kasutatud vastavate meioosi staadiumite markereid, siis ei saa öelda nende andmete põhjal, kas RIC8 puudus mõjutab hiirte spermatogeneesis meiotootilist jagunemist. Varasemalt on näidatud, et hiire munaraku meioosis sõltub RIC8 lokalisatsioon munarakus meioosi faasist, mistõttu võib sellel valgul eri staadiumitel erinev roll olla (Saare jt., 2015). Võrreldes noorte ja vanade nii *wt* kui ka *Stra8Ric8^{CKO}* genotüübiga isendeid, leiti, et loomade vananedes toimub Sertoli rakkude populatsiooni kahanemine väänilistes seemnetorukestes, nii *Stra8Ric8^{CKO}* kui ka *wt* loomadel (vastavalt 46% ja 40%). Toetudes varasematele uuringutele, on täheldatud isaste imetajate vananedes nende väänilistes seemnetorukestes vakuoolide teket, Sertoli rakkude funktsioonide vähenemist ning nende kadu (Tanemura jt., 1993). Ühtlasi väheneb ka spermatogeensete rakkude arv. Kuna Sertoli rakud on olulised spermatogeneesi protsessil, osaledes spermatogeensete rakkude transportimisel basaalmembraanilt luumenisse ning kaitstes väänilistes seemnetorukestes olevaid rakke autoimmuunsete reaktsioonide eest, kasvab ka isendi vananedes väänilistes seemnetorukestes olevate defektide hulk (Tanemura jt., 1993; Xia jt., 2011). Seega võib väita, et defektsete vääniliste seemnetorukeste osakaalu tõus ja Sertoli rakkude populatsioonide vähenemine testistes seoses isendi vananemisega on pigem normaalne ega ole mõjutatud RIC8 puudusest.

Koduhiirel algab postnataalne spermatogenees postembrüonaalsel arengupäeval P0, kui gonotsüüdid migreeruvad väänilise seemnetorukese basaalmembraanile. Antud protsess kestab kuni arengustaadiumini P3. Postnataalse spermatogeneesi vältel liiguvad spermatogeensed

rakud tugirakkude abil väänilise seemnetorukese basaalmembraanilt luumeni suunas ehk toimub pidev rakkude adhesioon ja migratsioon. Adhesiooni vahendamisel rakkude ja ekstratsellulaarse matriksi (ECM) vahel on olulised mitmed adhesioonimolekulid ning – valgud: nt. FAK (*focal adhesion kinase*), c-Src (*proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src*) ning c-Yes (*Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog-1*), mis põhinevad aktiini ankurdamisel (Qian jt., 2014). Üheks oluliseks valguks, mis osaleb retseptor türosiini kinaasi (RTK) poolt vahendatud aktiini tsütoskeleti ümberpaigutamisel ning sellest tulenevalt ka rakkude migratsioonil ja adhesioonil on GEF RIC8 ja tema interaktsioonipartner $G\alpha_{13}$ (Wang jt., 2011). Seega võib oletada, et RIC8 mõjutab rakkude fokaalset adhesiooni väänilistes seemnetorukestes ning rakkude ebakorrapärane paiknemine nendes või spermatogoonide,-tsüütide või –tiidide esinemine valendikus võib-olla põhjustatud just ebakorrektsest adhesioonist.

$\beta 1$ -integriin, mida leidub nii gonotsüütide kui ka SSC pinnal, on oluline valk ankurdamaks ekstratsellulaarse matriksi molekule, aktiveerides RhoA perekonda kuuluvaid valke (Shinohara jt., 1999). ECM matriksi üheks peamiseks komponendiks on laminiin, mis kasutab seostumiseks F-aktiini, mis on omakorda mõjutatud RhoA raja aktivatsioonist. Lisaks on näidatud äädikakärbsel, et profiliin, mis seostab F-aktiini, on vajalik spermatogoonsete eellasrakkude korrektseks paiknemiseks basaalmembraanil (Shields jt., 2014). Rho-A signaaliraja aktivatsioonil on oluliseks regulaatoriks RIC8 ja temaga seotud G-valgud ($G\alpha_{12/13}$ ja $G\alpha_q$) (Hart jt., 1998; Gong jt., 2010; Gabay jt., 2011).

Üheks oluliseks erinevuseks *Stra8Ric8^{CKO}* ja *wt* loomade vääniliste seemnetorukeste defektide seas oli mitteküpsete isassugurakkude (spermatogoonid, spermatotsüüdid, ümarad spermatiidid) sattumine seemnetorukese valendikku. Ehkki sellist defekti esines ka *wt* loomadel, siis *Stra8Ric8^{CKO}* loomadel oli sellist tüüp 3 defekti märgatavalt sagedamini. Üheks sellise defekti põhjuseks võib olla mehhaniline kudede käsitlemise/töötamise artefakt (esineb peamiselt üksikutes servaalade torukestes). Tõenäolisem variant võib olla seotud erinevate Sertoli rakkude häiretega, mistõttu pääsevad arenevad sugurakud valendikku (Lanning jt., 2002; Creasy jt., 2012). Tüüp 2 ja 3 iseloomulikud defektid nagu spermatogeense epiteeli degeneratsioon või kadumine, mis põhjustab nekrootilisi või atreetilisi väänilisi seemnetorukesti võivad olla seotud Sertoli rakkude kahjustustega (nt. tsütotoksilisuse, hüpoksia, põletiku või muu taolise poolt), isassugurakkude kahjustustega, vaskulaarsete ja hormonaalsete häiretega (Creasy jt., 2012). Kuna selliste defektide esinemissagedus oli kõigis vaadeldud rühmades võrdselt madalad nii kontrollhiirtes kui ka *Stra8Ric8^{CKO}* loomades võib öelda, et need olid juhuleiud. Huvitav leid oli iseloomulike ümaratest spermatiididest moodustunud rakukobarate

moodustumine luumeni servaalale (tüüp 4 defekt), mida leidis *Stra8Ric8^{CKO}* loomadel märgatavalt rohkem kui *wt* loomadel. Siinjuures tuleb märkida, et tegemist võib olla ka artefaktiga või valesti tõlgendatud defektiga. Teatud spermatogeense epiteeli faasis võivad sarnase struktuuriga kobaralaadsed spermatiidide kogumikud tekkida, ehkki mitte üksikuid ümaraid kobaraid. Sarnane situatsioon on 5 tüüpi defektiga, mida võib seostada nii lõikamise artefaktiga (nt. servalõik, tangeeritud lõik, rebenenud lõik) kui ka reaalse defektiga. Sarnaseid defekte esines nii *wt* kui ka *Stra8Ric8^{CKO}* loomadel. Oluline erinevus selle defekti sageduse osas ilmnis üllatuslikult hoopis vanemate *wt* ja *Stra8Ric8^{CKO}* isaste loomade võrdlemisel, mil selgus, et vanematel *wt* isastel esines selliseid struktuurseid häireid rohkem.

Kokkuvõtvalt näitavad need tulemused, et *Ric8* välja lülitamine põhjustab mitmesuguseid spermatogeneesi arenguhäireid, mis on küllaltki heterogeensed, kuid vaatamata sellele vajaksid edasist uurimist vastavate sugurakkude spetsiifiliste markeritega. Need oleksid olulised välja selgitamiseks täpsemalt näiteks meiootiliste rakkude hulka väänilistes seemnetorukestes, need aitaksid identifitseerida rakud, mis liiguvad valel ajal valendikku ning iseloomustada Sertoli rakke. Antud töös kasutatud *Stra8Cre*-rekombinaas lükkab *Ric8* välja spetsiifiliselt spermatogoonidest ja nende järglastest, samas Sertoli ja Leydigi rakud peaksid *RIC8* suhtes olema muutumatud. Kuna arenevate sugurakkude, Sertoli rakkude ja Leydigi rakkude vahel käib vastastikune signalisatsioon, siis oleks otstarbekas uurida edaspidi ka *Stra8Ric8^{CKO}* loomadel hormoonide taset, mis võib teatud tagaside mehhanismide häirituse tõttu olla muutunud.

KOKKUVÕTE

Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks oli välja selgitada RIC8 puudusest tingitud anatoomilised-morfoloogilised defektid väänilistes seemnetoukustes ning vääniliste seemnetorukeste rakkude populatsioonid, kasutades mudelina *Stra8Ric8^{CKO}* hiireliini.

Eksperimentaalses osas saadud tulemuste põhjal tehti järgnevad kokkuvõtavad järeldused:

1. RIC8 konditsionaalne väljalülitamine P3 arengujärgus olevatest spermatogoonidest ei põhjusta muutusi vääniliste seemnetorukestes olevate rakkude populatsioonides, võrreldes *wt* isendiga.
2. RIC8 konditsionaalne väljalülitamine P3 arengujärgus olevatest spermatogoonidest võib põhjustada mitmesuguseid morfoloogilisi ja anatoomilisi spermatogeneesi arenguhäireid, mis erinevad kohati vastavalt hiire vanusele. Peamisteks defektideks *Stra8Ric8^{CKO}* isendites võrreldes *wt* isenditega on spermatogeense epiteeli rakkude esinemine väänilise seemnetorukese valendikus ning ümmargustest spermatiididest koosnevate kobarate esinemine vääniliste seemnetorukeste valendiku äärealadel.

SUMMARY

The role of RIC8 in murine spermatogenesis using germ-cell specific conditional *Stra8Cre*^{+/+}*Ric8*^{lacZ/lox} mouse strain

Marko Leevik

Summary

Gametes are unique cells that provide a transmission of genetic information to the next generation. It has been shown that gametogenesis is a sensitive process which comprise symmetrical and asymmetrical. These processes are regulated by evolutionally conserved proteins, for instance RIC8, which regulates cell signalisation, adhesioon, migration and nervous system through G-proteins.

The first aim of the present study was to find out if the deletion of guanine nucleotide exchange factor RIC8 from germ cells cause morphological and anatomical defects in seminiferous tubules. In addition, the second aim was to compare the populations of spermatogenic cells and Sertoli cells in seminiferous tubules. A special germ cell specific conditional mouse strain *Stra8Cre*^{+/+}*Ric8*^{lacZ/lox} (previously constructed) was to evaluate the role of RIC8 in these processes. These mice lacked RIC8 since P3 spermatogonia until P7 pre-leptotene-stage spermatocytes. The results showed increased amount of morphological defects in seminiferous tubules among RIC8 *knock-out* mice. However, any affect to spermatogenic and Sertoli cell populations in seminiferous tubules was not detected in *Ric8* knock-out mice. In conclusion, these results indicate that the deletion of RIC8 from P3 spermatogonia may cause defects in seminiferous tubules.

KASUTATUD KIRJANDUS

- Afshar, K., Willard, F. S., Colombo, K., Johnston, C. A., McCudden, C. R., Siderovski, D. P., and Gonczy, P. (2004). RIC-8 is required for GPR-1/2-dependent Galpha function during asymmetric division of *C. elegans* embryos. *Cell* 119: 219-230.
- Afshar, K., Willard, F. S., Colombo K., Siderovski, D. P., Gönczy, P. (2005). Cortical localization of the Galpha protein GPA-16 requires RIC-8 function during *C. elegans* asymmetric cell division. *Development*. 123 (20): 4449-4459.
- Amoureux, M-C., Nicolas, S., Rougon, G. (2012). NCAM180 regulates Ric8a membrane localization and potentiates β -adrenergic response. *PloS ONE*. 7(2): e32216.
- Jianqiang Bao, J., Hsiu-Yen Ma, H-Y., Schuster, A., Lin, Y-M., Yan, W. (2013). Incomplete cre-mediated excision leads to phenotypic differences between *Stra8-iCre*; *Mov101*^{lox/lox} and *Stra8-iCre*; *Mov101*^{lox/ Δ mice}. *Genesis* 51: 481–490
- Bastiani, C., and Mendel, J. (2006). Heterotrimeric G proteins in *C. elegans*. *WormBook*, 1-25.
- Boitani, C., Di Persio, S., Esposito, V., Vicini, E. (2016) Spermatogonial cells: mouse, monkey and man comparison. *Semin Cell Dev Biol*. pii: S1084-9521(16)30068-4.
- Bowels, J., Koopman, P. (2007). Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development* 134: 3401-3411.
- Braun, R. E. (2001). Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat. Genet.* 28: 10-12.
- Bressler R. S., Ross M. H. (1972). Differentiation of peritubular myoid cells of the testis: effects of intratesticular implantation of newborn mouse testes into normal and hypophysectomized adults. *Biol of Repod* 6: 148-59.
- Chan, P., Thomas, C. J., Sprang, C. J., Tall, G. G. (2012). Molecular chaperoning function of Ric-8 is to fold nascent heterotrimeric G protein α subunits. *PNAS* 110: 3794–3799
- Cheng, J., Türkel, N., Hemati, N., Fuller, M. T., Hunt, A. J., Yamashita, Y. M. (2008). Centrosome misorientation reduces stem cell division during ageing. *Nature* 456 vol. 4
- Colombo, K., Grill, S.W., Kimple, R.J., Willard, F.S., Siderovski, D.P., and Gönczy, P. (2003). Translation of polarity cues into asymmetric spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Science* 300: 1957-1961.

- Couwenbergs, C., Spilker, A. C., Gotta, M. (2004). Control of embryonic spindle positioning and Galpha activity by C. elegans RIC-8. *Curr. Biol.* 14: 1871-1876.
- Creasy, D., Bube, A., de Rijk E., Kandori, H., Kuwahara, M., Masson, R., Nolte, T., Reams, R., Regan, K., Rehm, S., Rogerson, P., Whitney, K. (2012). Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicol Pathol* 40: 40-121.
- David, N. B., Martin, C. A., Segalen, M., Rosenfeld, F., Schweisguth, F., and Bellaiche, Y. (2005). Drosophila Ric-8 regulates Galphai cortical localization to promote Galphai-dependent planar orientation of the mitotic spindle during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* 7: 1083-1090.
- de Rooij, D. G. (1998). Stem cells in the testis. *J Exp Pathol.* 79 vol 2: 67–80.
- de Rooij, D. G. (2001). Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121 vol 3: 347–354.
- De Vries, L., Zheng, B., Fischer, T., Elenko, E. and Farquhar, M. G. (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 235-271.
- Drumond, A., L., meistrich, M., L., Chiarini-Garcia, H. (2011). Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. *Reproduction* 142: 145–155.
- Du, Q., Macara, I. G. (2004). Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins. *Cell.* 119 (4) : 503-16.
- Ewen, K. A., Koopman, P. (2010). Mouse germ cell development: from specification to sex determination. *Mol. Cell Endocrinol.* 323 (1): 76-93.
- Fawcett, D.W., Susumu, I., Slautterback, D. (1959). The Occurrence of Intercellular Bridges in Groups of Cells Exhibiting Synchronous Differentiation. *J Biophys Biochem Cytol.* 5 vol 3: 453–460.
- Fenech C., Patrikainen L., Kerr, D. S., Grall, S., Liu, Z., Laugerette, F., Malnic, B., Montmayeur, J. P. (2009). Ric-8A, Galpha protein guanine nucleotide exchange factor potentiates taste receptor signaling. *Front Cell Neurosci* 3: 11.
- Figuroa, M., Hinrichs, M.V., Bunster, M., Babbitt, P., Martinez-Oyanedel, J., and Olate, J. (2009). Biophysical studies support a predicted superhelical structure with armadillo repeats for Ric-8. *Protein Sci* 18: 1139-1145.

- Gabay, M., Pinter, M.E., Wright, F.A., Chan, P., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., and Tall, G.G. (2011). Ric-8 proteins are molecular chaperones that direct nascent G protein alpha subunit membrane association. *Sci. Signal* 4: 79.
- Gilman, AG. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615-649.
- Ginsburg, M., Snow, M. H. and McLaren, A. (1990). Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110: 521-528
- Godmann, M., Lambrot, R., and Kimmins, S. (2009). The dynamic epigenetic program in male germ cells: Its role in spermatogenesis, testis cancer, and its response to the environment. *Microsc. Res. Tech.* 72: 603-619.
- Gong, H., Shen, B., Flevaris, P., Chow, C., Lam, S. C., Voyno-Yasenetskaya, T. A., Kozasa, T., Du, X. (2010). G protein subunit Galpha13 binds to integrin alphaIIb beta3 and mediates integrin "outside-in" signaling. *Science*. 327 (5963): 340-3.
- Gotta, M., and Ahringer, J. (2001). Distinct roles for Galpha and Gbetagamma in regulating spindle position and orientation in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nat. Cell Biol.* 3: 297-300.
- Gotta, M., Dong, Y., Peterson, Y.K., Lanier, S.M., and Ahringer, J. (2003). Asymmetrically distributed *C. elegans* homologs of AGS3/PINS control spindle position in the early embryo. *Curr. Biol* 13: 1029-1037.
- Grill, S. W., Gonczy, P., Stelzer, E. H., and Hyman, A. A. (2001). Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature* 409: 630-633.
- Guttman J.A., Kimel G.H. & Vogl A.W. (2000) Dynein and plus-end microtubule-dependent motors are associated with specialized Sertoli cell junction plaques (ectoplasmic specializations). *J Cell Sci* 113 (12): 2167-76.
- Guttman, J. A., Takai, Y., Vogl, A. W. (2004). Evidence that tubulobulbar complexes in the seminiferous epithelium are involved with internalization of adhesion junctions. *Biol Reprod.* 71(2): 548-59.
- Hampoelz, B., Hoeller, O., Bowman, S. K., Dunican, D., and Knoblich, J. A. (2005). *Drosophila* Ric-8 is essential for plasma-membrane localization of heterotrimeric G proteins. *Nat Cell Biol* 7: 1099-1105.

- Hart, M.J., Jiang, X., Kozasa, T., Roscoe, W., Singer, W. D., Gilman, A. G., Sternweis, P. C., Bollag, G. (1998). Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science*. 280:2112–2114.
- Hess R.A. & Chen P. (1992) Computer tracking of germ cells in the cycle of the seminiferous epithelium and prediction of changes in cycle duration in animals commonly used in reproductive biology and toxicology. *J Androl* 13: 185-90.
- Hinrichs, M., Torrejon, M., Montecino, M., and Olate, J. (2012). Ric-8: different cellular roles for a heterotrimeric G-protein GEF. *J Cell Biochem*. 113 (9): 2797-805
- Horvitz, H. R., and Herskowitz, I. (1992). Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell* 68: 237-255.
- Kask, K., Ruisu, K., Tikker, L., Karis, K., Saare, M., Meier, R., Karis, A., Tambet, T., Margus Pooga, M. (2015). Deletion of RIC8A in neural precursor cells leads to altered neurogenesis and neonatal lethality of mouse. *Dev Neurobiol* 75 (9): 984-1002.
- Kimmins, S., Crosio, C., Kotaja, N., Hirayama, J., Monaco, L., Höög, C., van Duin, M., Gossen, J.A., and Sassone-Corsi, P. (2007). Differential functions of the Aurora-B and Aurora-C kinases in mammalian spermatogenesis. *Mol Endocrinol* 21: 726-739.
- Klattenhoff, C., Montecino, M., Soto, X., Guzman, L., Romo, X., Garcia, M. A., Mellstrom, B., Naranjo, J. R., Hinrichs, M. V., and Olate, J. (2003). Human brain synembryon interacts with Gsalpha and Gqalpha and is translocated to the plasma membrane in response to isoproterenol and carbachol. *J Cell Physiol* 195: 151-157.
- Lanning, L. L., Creasy, D. M., Chapin, R. E., Mann, P. E., Barlow, N. J., Regan, K. S., Goodman, D. (2002). Recommended Approaches for the Evaluation of Testicular and Epididymal Toxicity. *Toxicol Pathol* 30:507-20.
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3: 662-673.
- Lewis, J.D., Abbott, D.W., and Ausió, J. (2003). A haploid affair: core histone transitions during spermatogenesis. *Biochem Cell Biol* 81: 131-140.
- Ma, S., Kwon, H. J. and Huang, Z. (2012). RIC8, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for Heterotrimeric G proteins, Regulates Bergmann Glia-Basement Membrane Adhesion during Cerebellar Foliation. *J. Neurosci*. 32 (43): 14979-14993.

- Malik, S., Ghosh, M., Bonacci, T. M., Tall, G. G., Smrcka, A. V. (2005). Ric-8 Enhances G Protein $\beta\gamma$ -Dependent Signaling in Response to $\beta\gamma$ -Binding Peptides in Intact Cells. *Mol. Pharmacol.* 68(1): 129-36.
- Miller, K. G., Alfonso, A., Nguyen, M., Crowell, J. A., Johnson, C. D., and Rand, J. B. (1996). A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12593-12598.
- Miller, K. G., Emerson, M. D., McManus, J. R., and Rand, J. B. (2000). RIC-8 (Synembryn): a novel conserved protein that is required for G(q) α signaling in the *C. elegans* nervous system. *Neuron* 27: 289-299.
- Miller, K. G., Rand, J. B. (2000). A role for RIC-8 (Synembryn) and GOA-1 (G(o) α) in regulating a subset of centrosome movements during early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 156: 1649-1660.
- McLay, D.W., and Clarke, H.J. (2003). Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction* 125: 625-633.
- McLean, D. J., Friel, P. J., Johnston, D. S. and Griswold, M. D. (2003). Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. *Biol. Reprod.* 69: 2085-2091.
- Nagano, R., Tabata, S., Nakanishi, Y., Ohsako, S., Kurohmaru, M., Hayashi, Y. (2000). Reproliferation and Relocation of Mouse Male Germ Cells (gonocytes) During Prespermatogenesis. *The Anatomical Record* 258 (2): 210-220.
- Nagayoshi, S., Hayashi, E., Abe, G., Osato, N., Asakawa, K., Urasaki, A., Horikawa, K., Ikeo, K., Takeda, H., Kawakami, K. (2008). Insertional mutagenesis by the Tol2 transposon-mediated enhancer trap approach generated mutations in two developmental genes: *tcf7* and *synembryn-like*. *Development* 135: 159-169.
- Neer E.J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249-57.
- Neves, S. R., Ram, P. T., Iyengar, R. (2002). G protein pathways. *Science*. 296: 1636-9.
- Nishimura, A., Okamoto, M., Sugawara, Y., Mizuno, N., Yamauchi, J., Itoh, H. (2006). Ric-8A potentiates Gq-mediated signal transduction by acting downstream of G protein-coupled receptor in intact cells. *Genes Cells*. 11 (5): 487-98.

- O'Donnell L., Nicholls P.K., O'Bryan M.K., McLachlan R.I. & Stanton P.G. (2011) Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis* 1: 14-35.
- O'Donnell L., Pratis K., Wagenfeld A., Gottwald U., Muller J., Leder G., McLachlan R. I., Stanton P. G. (2009). Transcriptional profiling of the hormone-responsive stages of spermatogenesis reveals cell-, stage-, and hormone-specific events. *Endocrinology* 150: 5074-84.
- Phillips, B. T., Gassei, K., Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Phil. Trans. R. Soc. B* 365: 1663–1678
- Qian, X., Mruk, D. D., Cheng, Y-H., Tang, E. I., Han, D., Lee, W. M., Wong, E. W. P., Cheng, C. Y., (2014). Actin binding proteins, spermatid transport and spermiation. *Semin Cell Dev Biol.* 0: 75–85
- Reynolds, N. K., Schade, M. A., and Miller, K. G. (2005). Convergent, RIC-8-dependent Galpha signaling pathways in the *Caenorhabditis elegans* synaptic signaling network. *Genetics* 169: 651-670.
- Rodriguez, I., Ody, C., Araki, K., Garcia, I., Vassalli, P. (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 16 (9): 2262–2270.
- Russell, L., and Clermont, Y. (1976). Anchoring device between Sertoli cells and late spermatids in rat seminiferous tubules. *Anat Rec* 185: 259–278.
- Ruisu, K., Kask, K., Meier, R., Saare, M., Raid, R., Veraksitš, A., Karis, A., Tõnissoo, T., Pooga, M. (2013). Ablation of RIC8A Function in Mouse Neurons Leads to a Severe Neuromuscular Phenotype and Postnatal Death. *PloS ONE* 8 (8): e74031
- Russell L.D. (1979). Spermatid-Sertoli tubulobulbar complexes as devices for elimination of cytoplasm from the head region late spermatids of the rat. *Anat Rec* 194: 233-46.
- Russell L.D., Saxena N.K. & Turner T.T. (1989) Cytoskeletal involvement in spermiation and sperm transport. *Tissue Cell* 21: 361-79.
- Saare, M., Lulla, S., Tõnissoo, T., Meier, R., Kask, K., Ruisu, K., Karis, A., Salumets, A., Pooga, M. (2015). Expression Pattern and Localization Dynamics of Guanine Nucleotide Exchange Factor RIC8 during Mouse Oogenesis. *PLoS One.* 10 (6): e0129131.
- Sadate-Ngatchou, P. I., Payne, C. J., Dearth, A.T., Braun, R.E. (2008). Cre recombinase activity specific to postnatal, premeiotic male germ cells in transgenic mice. *Genesis.* 46 (12): 738-42.

- Sasaki, H., Matsui, Y. Epigenetic Events in Mammalian Germ-cell Development: Reprogramming and Beyond. *Nat. Rev. Genet.* 9 (2): 129–140.
- Schade, M. A., Reynolds, N. K., Dollins, C. M., and Miller, K. G. (2005). Mutations that rescue the paralysis of *Caenorhabditis elegans* ric-8 (synembryn) mutants activate the G alpha(s) pathway and define a third major branch of the synaptic signaling network. *Genetics* 169: 631-649.
- Schaefer, M., Petronczki, M., Dorner, D., Forte, M., Knoblich, J. A. (2001). Heterotrimeric G proteins direct two modes of asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. *Cell* 107: 183-194.
- Shields, A. R., Spence, A. C., Yamashita, Y. M., Davies, E. L., Fuller, M.T. (2014). The actin-binding protein profilin is required for germline stem cell maintenance and germ cell enclosure by somatic cyst cells. *Development* 141 (1): 73-82.
- Shinohara, K., Yanagisawa, A., Kagota, Y., Gomi, A., Nemoto, K., Moriya, E., Furusawa, E., Furuya, K., Tersawa, K. (1999) Physiological changes in Pachinko players; beta-endorphin, catecholamines, immune system substances and heart rate. *Appl. Human Sci.* 18: 37-42.
- Smrcka, A. V., Hepler, J. R., Brown, K. O., Sternweis, P. C. (1991). Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science*. 251: 804-7.
- Singer, W. D., Brown, H. A., Sternweis, P.C. (1997). Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu Rev Biochem.* 66: 475-509.
- Sprando R. L., Russell L. D. (1987) Comparative-Study of Cytoplasmic Elimination in Spermatids of Selected Mammalian-Species. *AM J ANAT.* 178: 72-80.
- Zamudio, N.M., Chong, S., and O'Bryan, M. K. (2008). Epigenetic regulation in male germ cells. *Reproduction* 136: 131-146.
- Zhao, G., Yang, Q., Huang, D., Yu, C., Yang, R., Chen, H., and Mei, K. (2005). Study on the application of parent-of-origin specific DNA methylation markers to forensic genetics. *Forensic Sci Int* 154: 122-127.
- Tall, G. G., Krumins, A. M., and Gilman, A. G. (2003). Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide exchange factor. *J Biol Chem* 278: 8356-8362.

- Tanemura, K., Kurohmaru, M., Kuramoto, K., Hayashi, Y. (1993). Age-related morphological changes in the testis of the BDF1 mouse. *J Vet Med Sci.* 55 (5): 703-10.
- Terada, N., Ohno, N., Saitoh, S., Saitoh Y., Komada, M., Kubota, H., Ohno, S. (2010). Involvement of a membrane skeletal protein, 4.1G, for Sertoli/germ cell interaction. *Reproduction* 139: 883-892.
- Thomas C. J., Tall G. G., Adhikari A., Sprang S. R. (2008) Ric-8A catalyzes guanine nucleotide exchange on G α_{i1} bound to the GPR/GoLoco exchange inhibitor AGS3. *J Biol Chem* 283: 23150-60.
- Tõnissoo, T., Kõks, S., Meier, R., Raud, S., Plaas, M., Vasar, E., and Karis, A. (2006). Heterozygous mice with Ric-8 mutation exhibit impaired spatial memory and decreased anxiety. *Behav Brain Res* 167: 42-48.
- Tõnissoo, T., Meier, R., Talts, K., Plaas, M., and Karis, A. (2003). Expression of ric-8 (synembryn) gene in the nervous system of developing and adult mouse. *Gene Expr Patterns* 3: 591-594.
- Tõnissoo, T., Lulla, S., Meier, R., Saare, M., Ruisu, K., Pooga, M., and Karis, A. (2010). Nucleotide exchange factor RIC-8 is indispensable in mammalian early development. *Dev Dyn* 239: 3404-3415.
- Upadhyay, R. D., Kumar, A., V., Ganeshan, M., Balasinor, N. H. (2012). Tubulobulbar complex: Cytoskeletal remodeling to release spermatozoa. *Reprod Biol Endocrinol.* 10: 27
- Vellano, C. P., Shu, F., Ramineni, S., Yates, C. K., Tall, G. G., Hepler, J. R. (2011). Activation of the Regulator of G Protein Signaling 14- G*ai1*-GDP signaling complex is regulated by Resistance to Inhibitors of Cholinesterase-8A. *Biochemistry* 50: 752-762.
- Vergouwen, R. P., S. G. Jacobs, R. Huiskamp, J. A. Davids, ja D. G. de Rooij. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil* 93 (1): 233–243.
- Walker W. H., Cheng J. 2005FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* 130: 15–28
- Wang, H., N., K. H., Qian, H., Siderovski, D. P., Chia, W., Yu, F. (2005). Ric-8 controls *Drosophila* neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. *Nat Cell Biol* 7: 1091-1098.

- Wang, L., Guo, D., Xing, B., Zhang, J. J., Shu, H-B., Guo, L., Huang, X-Y. (2011). Resistance to inhibitors of cholinesterase-8A (RIC8) is critical for growth factor receptor-induced actin cytoskeletal reorganization. *J. Biol. Chem.* 286 (35): 31055-31061.
- Wilkie, T. M., Kinch, L. (2005). New roles for G α and RGS proteins: communication continues despite pulling sisters apart. *Curr Biol* 15: R843-854.
- Wistuba, J., Stuckenborg, J. B., Luetjens, C. M. (2007). Mammalian spermatogenesis. *Functional Development and Embryology* 1: 99-117.
- Woodard, G. E., Huang, N. N., Cho, H., Miki, T., Tall, G. G., Kehrl, J.H. (2010). Ric-8A and G α recruit LGN, NuMA, and dynein to the cell cortex to help orient the mitotic spindle. *Mol Cell Biol* 30: 3519-3530
- Xia, W., Wong, C. H., Lee, N. P., Lee, W. M., Cheng, C. Y. (2011). Disruption of Sertoli-germ cell adhesion function in the seminiferous epithelium of the rat testis can be limited to adherens junctions without affecting the blood-testis barrier integrity: an in vivo study using an androgen suppression model. *J Cell Physiol.* 205 (1): 141-57.
- Young J. S., Guttman J. A., Vaid K. S., Shahinian H., Vogl A.W. (2009). Cortactin (CTTN), N-WASP (WASP), and Clathrin (CLTC) Are Present at Podosome-Like Tubulobulbar Complexes in the Rat Testis. *Biol. Reprod.* 80: 153-61.

LIHTLITSENTS

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Marko Leevik

(sünnikuupäev: 9.03.1994)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

RIC8 olulisuse uurimine spermatogeneesis, kasutades mudelina isassugurakkude spetsiifilist *Stra8Cre^{+/+}Ric8^{lacZlox}* hiireliini,

mille juhendajad on Sirje Lulla ja Tambet Tõnissoo,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 31.12.2019 autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2016